



seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Lehrstuhl für Sportmedizin

Leiter: Univ.- Prof. Dr. med. H. Gabriel

**Körperliche Leistungsfähigkeit und
„low-level-inflammation“: Klinische und
methodische Aspekte
im Rahmen experimenteller Studien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor philosophiae (Dr. phil.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Sozial- und Verhaltenswissenschaften der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom Biol. Hans Josef Müller

geboren am 14.09.1960 in Bubach/ Calmesweiler

Jena
2009

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. H.W. Gabriel, Jena
2. PD. Dr. med. J. Scharhag, Potsdam

Tag des Kolloquiums: 8. Januar 2010

Meinen Eltern und Geschwistern in Liebe gewidmet

0.1 Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Chronische subklinische Entzündungsreaktion	10
1.2	IL-6.....	11
1.3	CRP	13
1.4	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Verwendete Antikörper, Chemikalien und Geräte.....	16
2.2	Studiendesigns.....	17
2.2.1	Überblick über das Projekt.....	17
2.2.1.1	Studienabschnitt A: Labormethodenentwicklung und Validierung	18
2.2.1.2	Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme.....	20
2.2.1.3	Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetiken; CRP-Vollblut-Bestimmung	20
2.2.2	Probanden.....	21
2.2.2.1	Studienabschnitt A: Belastungsstudie mit Methodenvergleich.....	21
2.2.2.2	Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme.....	24
2.2.2.3	Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetiken; CRP-Vollblut-Bestimmung	24
2.3	Labormethoden.....	26
2.3.1	Probengewinnung und –verarbeitung.....	26
2.3.2	Probenmessung	28
2.3.2.1	IL-6-Bestimmung	28
2.3.2.2	CRP-Bestimmung.....	30
2.3.2.3	Laktatbestimmung	31
2.4	Statistik.....	31
3	Ergebnisse	34
3.1	Studienabschnitt A	34
3.1.1	ELISA-Entwicklung.....	34
3.1.1.1	Entwicklung und Optimierung des IL-6-ELISA	35
3.1.1.2	Entwicklung und Optimierung des CRP-ELISA.....	44
3.1.2	Belastungsstudien mit Referenzbestimmungsmethoden für CRP und IL-6.....	50
3.2	Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme.....	51

3.3 Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetiken; CRP-Vollblut-	
Bestimmung.....	52
4 Diskussion	56
4.1 Studienabschnitt A	56
4.1.1 Entwicklung und Optimierung der ELISA	56
4.1.2 Prävalidierung von CRP- und IL-6-ELISA	57
4.2 Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme.....	59
4.3 Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetiken; CRP-Vollblut-	
Bestimmung	60
4.4 Methodenkritik.....	63
5 Zusammenfassung	64
6 Literatur	66
7 Anhang	76
7.1 Tabellen.....	76
7.2 Ergebnisausdrucke Ringversuche	89
7.3 Arbeitsanleitungen	92
7.3.1 Arbeitsanleitung: Ultrasensitiver CRP-ELISA.....	92
7.3.2 Arbeitsanleitung: Sensitiver human IL-6-Sandwich-ELISA.....	96
8 Danksagung.....	101
9 Eidesstattliche Erklärung	102
10 Lebenslauf	103

0.2 Abkürzungsverzeichnis

APP	= Akute-Phase-Proteine
APR	= Akute-Phase-Reaktion
BE-technik	= Blutentnahmetechnik
BSA	= Bovines Serumalbumin
BSF2	= B-Zell-stimulierender Faktor 2
CDF	= Cytotoxic Differentiation Factor
CRP	= C-reaktives Protein
ER	= Endoplasmatisches Retikulum
Fc-Rezeptor	= Membranrezeptoren für Immunglobuline
Fc γ -Rezeptor	= binden an die Fc-Domäne des Ig-G
Fc γ RI-Rezeptor	= Strukturtyp des Fc γ -Rezeptor
Fc γ RII-Rezeptor	= Strukturtyp des Fc γ -Rezeptor
HPGF	= Human Prostatoc Growth Factor
HPR-POD	= Meerettich-Peroxidase
HSF	= Hepato-Cyte-stimulating Factor
ICC	= Interclass-Coeffizient
IFN- β 2	= Interferon-Beta 2
IgG	= Immunglobulin G
IgE	= Immunglobulin E
IL-6	= Interleukin-6
IL-6R	= Interleukin-6-Rezeptor
IL-HP1	= T cell-derived hybridoma growth factor
INF- γ	= Interferon-gamma
26-K	= 26-kd Protein
kDa	= Kilo-Dalton
Mw	= Mittelwert
PCT-GF	= Plasmacytoma-Growth-Factor
POD	= Peroxidase
PBS	= Phosphat-Puffer
SNP	= single nucleotide polymorphism
Stabw	= Standardabweichung
TNF- α	= Tumornekrosefaktor-alpha

0.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über das Gesamtprojekt.....	18
Abbildung 2: Entwicklungsschema bis zur praktischen ELISA-Anwendung	18
Abbildung 3: Arbeitsschritte bei der automatisierten IL-6-Bestimmung	29
Abbildung 4: Reaktionsschema CRP-Nachweis durch kinetische Immunnephelometrie	31
Abbildung 5: Grobtitrierung des IL-6-ELISA	36
Abbildung 6: Gesamtheit der Standardkurven für Antikörperkonzentrationskombinationen .	38
Abbildung 7: Der Einfluss des Probendiluents auf die Standardkurve.....	39
Abbildung 8: Detektor-Titrationskurven für den CRP-ELISA	45
Abbildung 9: Der Einfluss von Harnstoff im Diluent auf die Eichkurve.....	46
Abbildung 10: Konzentrationsbereiche der Präzisionskontrollen.....	47
Abbildung 11: Belastungsinduzierte Veränderungen der CRP-Konzentrationen.....	53
Abbildung 12: Belastungsinduzierte Veränderungen der IL-6-Konzentrationen	54
Abbildung 13: Vergleich unterschiedliche Belastungsarten und Zunahme der Plasma-IL-6 Konzentration	62

0.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper	16
Tabelle 2: Chemikalien	16
Tabelle 3: Geräte	16
Tabelle 4: Materialien	17
Tabelle 5: Validierungskriterien und –parameter für die ELISA-Anwendung.....	19
Tabelle 6: CRP- und IL-6 Bestimmungsmethoden im Rahmen dieser Dissertation.....	19
Tabelle 7: Anthropometrische Daten der Probanden aus dem Studienabschnitt A	22
Tabelle 8: Leistungsparameter im fahrradergometrischen Stufentest.....	23
Tabelle 9: Anthropometrische Daten der Probanden aus dem Studienabschnitt B	24
Tabelle 10: Leistungsdaten; fahrradergometrischer Stufentest.....	25
Tabelle 11: Leistungsdaten der Laufbandergometrie.....	25
Tabelle 12: Anthropometrische Daten der Probanden aus dem Studienabschnitt C	26
Tabelle 13: Leistungsdaten; fahrradliegend spiroergometrischer Stufentest.....	26
Tabelle 14: Testbestandteile für optimale Sensitivität eines ELISA	35
Tabelle 15: Verwendete Antikörper- und Standardkonzentration für die erste Grobtitration .	37
Tabelle 16: Optische Dichten der Standards	37
Tabelle 17: Überprüfung der Ur-Standardkurve auf Erfüllung von Anforderungskriterien....	38
Tabelle 18: Zusammensetzung der Diluents	39
Tabelle 19: Mittlere Extinktionen der Standards in Abhängigkeit von der HPR-POD-Konz. .	40
Tabelle 20: Mittlere Extinktionen der Standards in Abhängigkeit von der Detektor- Inkubationszeit	40
Tabelle 21: Intra- und Interassay-Präzisionsmessungen des IL-6-ELISA.....	42
Tabelle 22: Optimierungsmaßnahmen am IL-6-ELISA.....	43
Tabelle 23: Wiederfindung und Verdünnung einer IL-6-Probe.....	44
Tabelle 24: Intra- und Interassay-Präzisionsmessungen des hs-CRP-ELISA.....	46
Tabelle 25: Wiederfindung und Verdünnung einer CRP-Probe	48
Tabelle 26: Verdünnungsstufen und Wiederfindung von 2 CRP-Proben	48
Tabelle 27: Eingesendete Ergebnisse des CRP-Ringversuches	49
Tabelle 28: CRP-Ringversuch: Qualitative / quantitative Zielwerte	50
Tabelle 29: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) der CRP-Messungen im Methodenvergleich.....	50
Tabelle 30: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) der IL-6-Messungen im Methodenvergleich.....	51

Tabelle 31: Belastungsinduzierte Plasma-CRP-Kinetik	52
Tabelle 32: Belastungsinduzierter IL-6-Anstieg.....	53
Tabelle 33: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) Tabelle 30: MW und Stabw der IL-6-Messungen im Methodenvergleich.....	54
Tabelle 34: Vergleich der CRP-Vollblutmethode mit der intravenösen und kapillären Blut- entnahmetechnik für die CRP-Plasma-Bestimmung.....	55
Tabelle 35: Anthropometrische Daten der Probanden aus Studienabschnitt.....	76
Tabelle 36: Leistungsdaten der Probanden aus Studienabschnitt A	77
Tabelle 37: Leistungsdaten der Probanden aus Studienabschnitt B.....	78
Tabelle 38: IL-6 und CRP-Werte der Probanden aus Studienabschnitt B	82
Tabelle 39: Studienabschnitt-C: Anthropometrische Daten der Probanden - IL-6-Kinetik- Studie.....	86
Tabelle 40: Studienabschnitt-C: Leistungsdaten der Probanden - IL-6-Kinetik-Studie	87
Tabelle 41: Studienabschnitt C – IL-6-Kinetik.....	87
Tabelle 42: Studienabschnitt C – CRP-Kinetik	88

1 Einleitung

Zentrale Parameter der vorliegenden Arbeit waren Interleukin-6 (IL-6) und C-reaktives Protein (CRP). IL-6 agiert auf der hormonell-regulatorischen Ebene der Akute-Phase-Reaktion (APR), während das Opsonin CRP auf der Effektorebene in das Geschehen der APR eingreift.

Chronische subklinische Entzündungsreaktion

Die chronische subklinische Entzündungsreaktion („low-level-inflammation“ = „low grade Inflammation“) ist an der Entstehung einer Vielzahl von schwerwiegenden Erkrankungen beteiligt und wird in der Literatur schon lange im Kontext der Arteriosklerose beschrieben (27). Im Verlaufe solcher chronisch subklinischen Entzündungen kommt es zu einer kaskadenartigen Sezernierung von Zytokinen am Ort des arteriosklerotisch veränderten Endothelgewebes (76). Solche Entzündungsmediatoren rekrutieren die klassischen Entzündungszellen Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten (44). Die lokale Entzündungsreaktion initiiert über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine die Synthese von Akute-Phase-Proteinen (APP) und anderer Entzündungsmediatoren (23). Über diesen Mechanismus wird die lokale Entzündungsreaktion von einer systemischen Entzündungsreaktion begleitet. (33).

Akute Körperarbeit führt zu qualitativen und quantitativen Veränderungen vieler humoraler Blutparameter, ähnlich einer niedriggradigen Entzündungsreaktion. Allerdings sinken die Werte der Entzündungsparameter nach körperlicher Belastung relativ schnell wieder auf das Ausgangsniveau vor Belastung. Um das Ausmaß einer Entzündungsreaktion zu beschreiben eignen sich vor allem solche Marker, die schnell und deutlich ansteigen (35).

Der CRP-Spiegel steigt bei Entzündungen infektiöser und nichtinfektiöser Art, und zwar schneller und deutlicher als die anderen APP. Noch schneller reagiert das Zytokin IL-6. Der IL-6-Anstieg erfolgt 2-4 Stunden nach dem akuten Entzündungsereignis, während CRP erst nach 6-12 Stunden ansteigt (25).

In der Proteindiagnostik der Low-Level Inflammation nimmt das CRP auch aus anderen Gründen die bedeutendste Rolle ein: Die CRP-Serumkonzentration spiegelt die tatsächliche Syntheserate in der Leber wider. Die entsprechende Präanalytik ist unkompliziert und es steht eine Vielzahl zuverlässiger hochsensitiver Messinstrumente für die Diagnostik zur Verfügung. Die CRP-Bestimmung ist kostengünstig und bei Verwendung von modernen Analysesystemen zeiteffizient (42).

Unter den Zytokinen ist IL-6 für die APR am auffälligsten, weil es im Falle einer

Entzündungssituation bzw. nach einer anstrengenden körperlichen Ausdauerbelastung am schnellsten und stärksten in seiner Konzentration ansteigt (60). Zudem ist IL-6 neben Interleukin-1 der Hauptinitiator für die CRP-Synthese in den Hepatozyten (40). IL-6 ist ein wichtiger diagnostischer Marker bei vielen entzündlichen Erkrankungen wie z.B. für die Verlaufskontrolle und Prognose bei Sepsis (25).

Ein erhöhter IL-6-Spiegel im Serum gilt als eigenständiger Risikofaktor für Arteriosklerose und Herzinfarkt (71).

Interleukin-6

IL-6 besteht aus einer Polypeptidkette von 212 Aminosäuren. Das Molekulargewicht variiert zwischen 21 und 28 kDa aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungen und Phosphorylierungen an den Aminosäurepositionen 73 und 172 (51). Die Glykosylierung ist für die biologische Aktivität entscheidend, weil deglykosyliertes IL-6 nur zu 35% aktiv ist (14). IL-6 gehört in die Familie der sogenannten langkettigen 4- α -Helix-Bündel-Zytokine. Typisch für diese Zytokingruppe sind vier antiparallel zu einem Bündel angeordnete α -Helices (6).

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen wurde IL-6 in der Vergangenheit unterschiedlich bezeichnet. Erstmals beschrieben 1983 als „hepato-cyte-stimulating factor“ = **HSF** (73), später auch als „human prostatic growth factor“ **HPGF** (55), „B-Zellenstimulierender Faktor 2“ = **BSF2** (31), „Plasmacytoma-Growth-Factor“ = **PCT-GF** (43), „Interferon-Beta 2“ **IFN- β 2** (107), „26-kd protein“ = **26-K** (26), „T cell-derived hybridoma growth factor“ = **IL-HP1** (89), „cytotoxic differentiation factor“ = **CDF** (87) bezeichnet. Poupart et al. schlugen 1987 den Namen „Interleukin-6“ für dieses unterschiedlich bezeichnete, multifunktionelle Zytokin vor (70).

Das Gen für menschliches Interleukin-6 ist auf dem Chromosom-7 (78) in der Region 7p21 lokalisiert (7).

Interleukin-6 wird nach Induktion durch Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor-alpha (79, 80) von einer Vielzahl aktivierter Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und auch von kontrahierenden Skelettmuskelzellen sezerniert (61, 67).

Die IL-6-Signaltransduktion an der Zielzelle beginnt mit der Bindung des Zytokins an den IL-6-Rezeptor (IL-6R). Die Rezeptoraktivierung wird fortgesetzt durch die Interaktion des IL-6/IL-6R-Komplexes mit dem Glykoprotein gp130. Die fortlaufende intrazelluläre Signaltransduktion umfasst neben der Aktivierung bzw. Phosphorylierung von verschiedenen

Kinasen, Proteinen und Transkriptionsfaktoren die Expression von induzierbaren Genen, die die Proliferation und Differenzierung IL-6-sensitiver Zielzellen auslösen (29).

Eine wichtige systemische Wirkung des IL-6 ist die Regulation der APR. Gewebeerstörungen bzw. Entzündungen (3, 12) induzieren die APP-Synthese aus den Hepatozyten. Dies geht einher mit einer gesteigerten APP-Sekretion in der Leber und zeigt sich am schnellsten und deutlichsten beim CRP-Serumspiegel. Weitere charakteristische systemische Reaktionen des Organismus sind u.a. Fieber, Tachykardie und Leukozytose. Dieser Prozess fördert vor allem Wundheilung, reguliert die Gerinnungskaskade und steigert die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen (4).

Weil Muskelkontraktionen auch immer mit geringfügigem Schaden der kontraktilen Filamente verbunden sind, führt akute Körperarbeit zu qualitativen und quantitativen Veränderungen vieler humoraler Blutparameter ähnlich einer Entzündungsreaktion, die durch Krankheitserreger oder durch äußere Verletzungen induziert worden ist (8, 53). Insbesondere die Zytokine reagieren hierbei als Netzwerk sich gegenseitig beeinflussender Faktoren in Verknüpfung mit den Immunzellen. Viele Studien belegen, dass die Konzentration einiger pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Serum während und nach anstrengender körperlicher Belastung ansteigt (83, 62, 76).

Der belastungsinduzierte Anstieg von IL-6 im Serum wurde 1991 erstmals von Northoff und Berg beschrieben (56). Der Konzentrationsanstieg von IL-6 während Körperarbeit wurde in zahlreichen anderen Studien belegt und kann bei extrem lang andauernden Belastungen bis zum Faktor 8000 gegenüber dem Ruhewert betragen (50).

Chronische subklinische Entzündung führt zu einem 2 bis 3 fachen Anstieg des IL-6-Ruhewert gegenüber dem Normalbereich (76, 67). Einige Studien belegen, dass die IL-6-Baseline-Werte circadianen und diurnalen Rhythmen unterliegen (82, 95). Zudem wird der IL-6-Basiswert von einem Genpolymorphismus beeinflusst und beruht auf einem Basenaustausch in der Promotorregion des IL-6 Gens. Dieser sogenannte SNP (single nucleotide polymorphism) beeinflusst sowohl die Transkriptionsrate des IL-6-Gens als auch die Interleukin-6 Spiegel (19, 89). Auf Grund der Variabilität des IL-6-Basiswertes ist zur Abschätzung des Arteriosklerose-Risikos der CRP-Baseline-Wert dem IL-6 vorzuziehen (siehe auch Kapitel 1.3).

C-reaktives Protein

Ein wichtiger und zentraler Parameter zur Messung der low-level-inflammation ist das C-reaktive Protein (CRP). Es ist ein kohlenhydratfreies APP mit einer homopentameren Struktur. Jeder der fünf cyclisch angeordneten Untereinheiten besteht aus 187 Aminosäuren, die über nichtkovalente Bindungen zusammengehalten werden. Das Molekulargewicht einer Untereinheit beträgt 21.500 Dalton (57). Wegen seiner charakteristischen pentameren Struktur gehört das CRP zur Proteingruppe der Pentraxine, die allesamt neben Ihrer Ca^{2+} -bindenden Fähigkeit Immunabwehreigenschaften besitzen (58). Um proarteriosklerotisch wirken zu können, muss das CRP eventuell zuerst von seiner pentameren in eine monomere Form überführt werden (93).

Die 1q21-Region des menschlichen Chromosom 1 codiert die Aminosäuresequenz der Pentraxine, einschließlich des CRP (20, 39, 101). In dieser Region befinden sich noch zahlreiche andere Gene für Proteine mit immunologischen Funktionen wie z.B. Fc-Rezeptoren für IgE und IgG (101).

Tillet entdeckte 1930 das CRP im Serum von Pneumonie-Kranken (90). 1941 wurde der unspezifisch immunologische Charakter die Reaktion zwischen dem C-Polysaccharid von Pneumokokken und diesem „C-reaktiven“ Protein in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen beschrieben (48). CRP bindet also Ca^{2+} -abhängig spezifisch an Phosphocholin, einem Bestandteil vieler Bakterien- und Pilz-Polysacchariden und der meisten biologischen Zellmembranen (98, 99). CRP bindet auch an einigen Zellkernbestandteile, die kein Phosphocholin enthalten (74, 97). Durch Opsonierung von Mikroorganismen oder körpereigener Zelltrümmer aktiviert CRP das Komplementsystem über Ligandenbindung (54) und stimuliert Phagozyten über den Fc γ RI- und Fc γ RII-Rezeptor. Auch B- und T- Lymphozyten werden über die Opsoninwirkung des CRP stimuliert (94). Darüber hinaus scheint CRP auch die Bildung des antiinflammatorisch wirkenden und gefäßschützenden Stickoxids (NO) zu hemmen (92, 93, 95) und den nukleären Transkriptionsfaktor-(NF-) κ B zu aktivieren, der zusätzliche Entzündungsreaktionen hervorruft (92). Die proinflammatorische Wirkung des CRP ist auch durch den Anstieg bestimmter Adhäsionsmoleküle bedingt (100).

Hauptsyntheseort für CRP ist die Leber (21). Interleukin-6, TNF- α , Interleukin-1 und INF- γ sind die wichtigsten Induktoren für die hepatische CRP-Produktion (84, 23).

Die CRP-Synthese wird auf Transcriptionsebene induziert. Dabei bindet der stimulierte Transkriptionsfaktor c/EBPbeta an den CRP-Promotor. Eine zusätzliche Verstärkung bewirkt die Bindung des c-Rel-Protein an c/EBPbeta (2). Nach Synthese wird das CRP in eine Speicherform überführt, indem es an 2 verschiedene Carboxylesterase konjugiert und im

Endoplasmatischen Retikulum (ER) gelagert wird. Im Entzündungsfalle vermindert sich die Bindungsaffinität von CRP an sein Konjugat, so dass CRP aus dem ER dissoziieren kann (106).

Akute körperliche Belastungen induzieren Gewebeschädigungen und damit eine APR mit einem Anstieg der CRP-Konzentration im Serum (22). Dieser CRP-Anstieg ist nur vorübergehend und selbst bei lang andauernden Belastungen vergleichsweise geringfügig. CRP steigt mit einer Verzögerung von 6-12 Stunden im Blut an und erreicht seinen Gipfelpunkt nach ca. 2 Tagen. Die CRP-Plasmahalbwertszeit beträgt etwa 19 Stunden und wird ausschließlich durch die Syntheserate in den Hepatocyten determiniert und wird auch nicht durch inflammatorische Prozesse beeinflusst. Aufgrund dieser relativ langen Plasmahalbwertszeit kann der Marker einige Tage erhöht bleiben (96). CRP unterliegt keiner wesentlichen zirkadianen Rhythmik (45).

CRP ist ein wichtiger unspezifischer Entzündungsparameter, der für die Diagnose und Therapie vieler Krankheiten bedeutsam ist und konnte in arteriosklerotischen Plaques in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (10).

Darüber hinaus gibt der CRP-Baseline-Wert im Serum Hinweise auf arteriosklerotische Veränderungen des Blutgefäßsystems (Initiation, Progression bis zur Plaqueerosion und Plaqueruptur), wenn eine andere entzündliche Erkrankung als Ursache für einen erhöhten CRP-Wert ausgeschlossen werden kann (76). In der Literatur beschriebene Obergrenzen teilen die untersuchten Personen je nach CRP-Plasmawert in unterschiedliche Risikogruppen ein (66):

- < 1,0 mg CRP/l geringes Risiko
- 1,0 – 3,0 mg CRP/l mittleres Risiko
- > 3,0 mg CRP/l hohes Risiko

Einige Studien zeigen, dass der CRP-Plasmabasiswert eine mittlere Heritabilität von 0,35 bis 0,40 aufweist (41, 63, 47), wobei der CRP-Baselinespiegel keinem zirkadianem und diurnalem Rhythmus zu unterliegen scheint. (52). Zudem waren in einer Querschnittstudie die CRP-Basiswerte einer japanischen Bevölkerungsgruppe über einen Zeitraum von 5 Jahren keinen intraindividuellen Schwankungen unterworfen (36). Aufgrund dieser Stabilität und Konstanz der Baseline-Werte eignet sich CRP als Marker zur Risikoabschätzung von Arteriosklerose in besonderem Maße.

1.4 Fragestellungen

Auf der Basis etablierter IL-6- und CRP-Bestimmungsmethoden, deren Entwicklung in dieser Dissertation genau beschrieben wird, ergeben sich für diese Arbeit und auch für zukünftige Belastungsstudien folgende Fragestellungen:

- (1) Wie muss ein hochsensitives ELISA-Messsystem zur Bestimmung von Interleukin-6 bzw. für C-reaktives Protein modifiziert werden, so dass es sich im Rahmen sportmedizinischer Fragestellungen für die Analyse anwenden lässt?
- (2) Sind die Ergebnisse der Interleukin-6 und CRP-ELISA Bestimmungen mit anderen Bestimmungsmethoden vergleichbar?
- (3) Eignen sich kapilläre Blutentnahmesysteme für die Probengewinnung zur Bestimmung von Plasma-IL-6 und Plasma-CRP in Belastungsstudien?
- (4) Stimmen die in der Literatur beschriebenen, durch Körperarbeit induzierten IL-6- und CRP-Anstiege mit den Ergebnissen der hier beschriebenen Belastungsstudien überein?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Antikörper, Chemikalien und Geräte

Tabelle 1 bis 4 zeigen die verwendeten Antikörper, Chemikalien, Geräte und Materialien für die ELISA-Entwicklungen und für die IL-6- und CRP-Bestimmungen.

Tabelle 1: Antikörper

Name	Hersteller
anti-human-IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
biotinylierter anti-human-IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-human- CRP	Fitzgerald, Concord, USA
POD konjugierter anti-human-CRP	Bethyl, Montgomery, USA

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller
BSA Fraktion V	PAA Laboratories, Pasching Österreich
Karbonat-Bikarbonat-Kapseln	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbeccos PBS	GIBCO, Karlsruhe, Deutschland
human CRP-Standard	Ortho-Clinical, Neckargemünd, Deutschland
rekombinantes lyophilisiertes human IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Schwefelsäure 0,5 N	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Streptavidin- Peroxidase-Konjugat	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 3: Geräte

Name	Hersteller
Access ® Immunoassay System	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Blutbildautomat Coulter AcT Dif	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Image Immunnephelometriesystem	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Ergometrics 900 ®	Ergoline GmbH, Bitz, Deutschland
Herafreeze Tiefrierschrank	Kendro, Hanau, Deutschland
Herzfrequenzmessgerät	Polar, Büttelborn, Deutschland
Laktatmessgerät Ebio Basic	EKF Diagnostic, Barleben, Deutschland
Metalyser II	Cortex, Leipzig, Deutschland
Plattenreader Dynatech MR 4000	Dynatech, Boston, USA
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Materialien

Name	Hersteller
Bidestilliertes Wasser	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Laktatröhrchen/ Glaskapillaren/ Lanzetten	EKF Diagnostic, Barleben, Deutschland
MaxiSorb-Microtiterplatten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Monovetten, Einmalkanülen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipetten und Spitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Stufendesigns

2.2.1 Überblick über das Gesamtprojekt

Ziel des Projektes war es, geeignete und kostengünstige Messmethoden für die relevanten Entzündungsparameter CRP und IL-6 zu etablieren, die den Zusammenhang zwischen körperlicher Leistungsfähigkeit und subklinischer bzw. belastungsinduzierter Inflammation beschreiben. Zusätzlich sollte die Probengewinnung zur Messung von CRP und IL-6 vereinfacht werden, indem die intravenöse Blutentnahme durch die kapilläre Blutentnahme ersetzt wird. Mit Hilfe dieser etablierten Labormethoden sollten belastungsinduzierte IL-6- und CRP-Kinetiken dargestellt werden.

Im Studienabschnitt A wurden dafür 2 ELISA-Systeme zur Quantifizierung der CRP- bzw. IL-6-Konzentration im Plasma bzw. Serum entwickelt und optimiert. Innerhalb dieser Vorbereitungsphase erfolgte die Anwendung dieser Analysemethoden in einer Belastungsstudie, um quasi die Testsysteme in einem „Prä“-Validierungsschritt zu überprüfen. Zusätzlich wurden die Proben jeweils mit einer bereits validierten klinischen automatisierten Referenzmessmethode für CRP- und IL-6 auf Gleichheit geprüft.

Im zweiten Studienabschnitt wurde die Blutentnahmetechnik modifiziert. Dazu erfolgte ein Vergleich der kapillären und der intravenösen Blutentnahmetechnik zur IL-6- und CRP-Bestimmung zeitgleich am selben Probanden. Ziel dieses Studienabschnittes war es, sicher zu stellen, dass die kapilläre Blutentnahmetechnik für zukünftige Feldtests und sonstige Fragestellungen, in denen minimal invasive Blutentnahmen sinnvoll sind, eine gleichwertige CRP- und IL-6-Messung ermöglicht.

Im dritten und letzten Teil dieser Dissertation wurden aufgrund der unterschiedlichen Plasmahalbwertszeiten von IL-6- und CRP die jeweiligen Kinetiken in 2 verschiedenen Belastungsstudien mit jeweils spezifisch optimalen Blutentnahmezeiten untersucht.

Abbildung 1 gibt einen graphischen Überblick über das Gesamtprojekt.

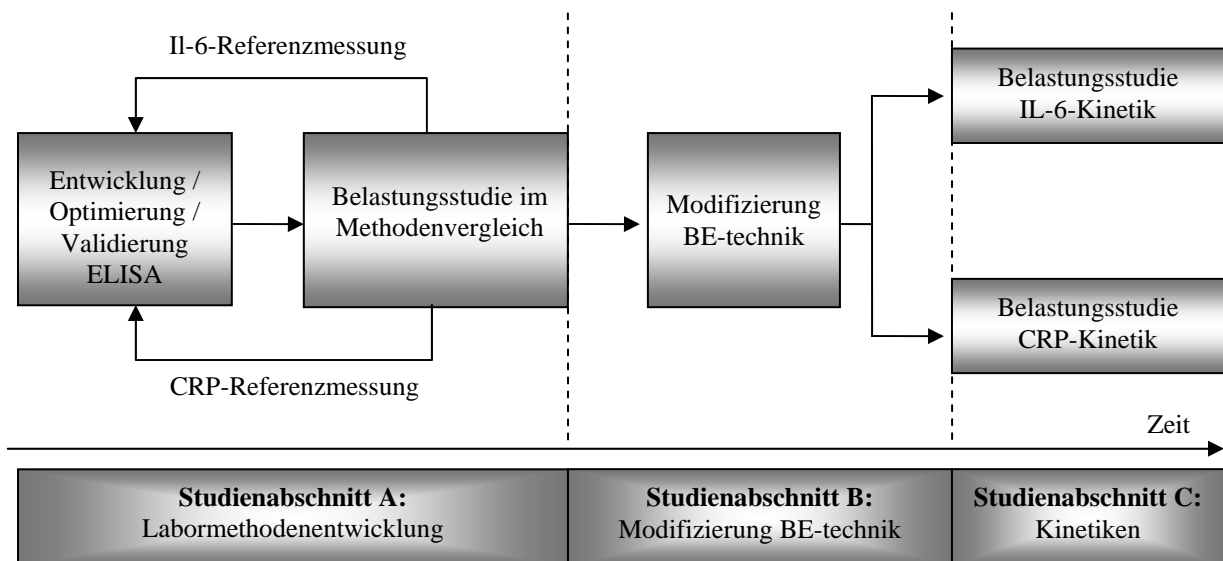


Abbildung 1: Überblick über das Gesamtprojekt

2.2.1.1 Studienabschnitt A: Labormethodenentwicklung und Validierung

ELISA-Entwicklung

Eine häufig angewandte Methode zur Quantifizierung von Zytokinen und CRP in Forschung und Klinik ist der „enzym linked immunoabsorbent assay“, kurz ELISA genannt. Eine besondere Variante ist der so genannte „Sandwich-ELISA“. Dieser Immunoassay wird in zahlreichen Publikationen im Zusammenhang mit IL-6- und CRP-Bestimmung beschrieben und ist ein gängiges Analyseverfahren in der Proteindiagnostik. Deshalb soll an dieser Stelle auf die angegebene Literatur verwiesen werden (38, 68).

Nach erfolgter Entwicklung und Optimierung ist eine adäquate Validierung eines laboranalytischen Verfahrens für die Anwendung in Studien entscheidend (siehe Abb. 2). Die spezifischen Fragestellungen bestimmen den Umfang der Validierung für das jeweilige Messsystem. Tabelle 5 stellt die Validierungskriterien für unsere ELISA's dar. Bei der Durchführung des Validierungsverfahrens wurden besonders die Empfehlungen des „Guide for Industry – Bioanalytical Method Validation“ beachtet (15).



Abbildung 2: Entwicklungsschema bis zur praktischen ELISA-Anwendung

Tabelle 5: Validierungskriterien und Validierungsparameter für die ELISA-Anwendung

Validierungskriterium	Validierungsparameter
Zuverlässigkeit des Messbereichs	Standardüberprüfung Wiederfindung
Nachweisbare Mindestkonzentration	Sensitivität
Abweichungen der Messwerte vom wahren Messwert	Interassay-Präzision Intraassay-Präzision
Minimierung von Störgrößen	Kreuzreaktivität der Assay-Antikörper und unspezifische Bindung

Erster Validierungsschritt: Messungen von IL-6 und CRP im Methodenvergleich

Im Rahmen einer Belastungsstudie wurden IL-6 und CRP aus EDTA-Plasmaproben mit den photometrisch detektierenden ELISA's gemessen. Die Ergebnisse dieser laboreigenen Analysesysteme wurden mit Referenzmethoden verglichen. Tabelle 6 zeigt die Bestimmungsmethoden im Überblick.

Tabelle 6: CRP- und IL-6-Bestimmungsmethoden im Rahmen dieser Dissertation

Parameter	Bestimmungsmethode	Referenzmethode
CRP	2-Schritt-Sandwich-ELISA (photometrisch)	Ultrasensitive kinetische Immunnephelometrie
IL-6	2-Schritt-Sandwich-ELISA (photometrisch)	1-Schritt-Sandwich-ELISA (Chemilumineszenz)

Um den belastungsinduzierten Anstieg von IL-6 über ein möglichst breites Spektrum erfassen zu können, bildeten zwei unterschiedlich leistungsfähige Personengruppen das Probandenkollektiv: 18 Patienten mit klinisch erfasster Majordepression und eine Kontrollgruppe aus 27 gesunden Personen. Alle Probanden wurden vor der Belastung körperlich untersucht und anamnestisch erfasst.

Die Studienteilnehmer (n=45) absolvierten zur Beurteilung ihrer Leistungsfähigkeit eine stufenförmig ansteigende sitzende Fahrradergometrie (Ergometrics 900®, Ergoline, Bitz, Deutschland) mit Laktatanalyse und Atemgasanalyse bis zur subjektiven Erschöpfung. Die erste Stufe der Belastung begann mit 25 Watt. Nach jeder dritten Minute erhöhte sich die Belastung um 25 Watt bis zur subjektiven Erschöpfung. Die Blutentnahmen zur Analyse der Entzündungsparameter erfolgten unmittelbar vor und nach der Belastung intravenös aus der Ellenbeuge. Die Blutproben wurden schnellstmöglich zentrifugiert, aliquotiert und bei -85°C tief gefroren. Die kapillären Blutentnahmen zur Laktatanalyse wurden vor der Belastung, am Ende jeder Leistungsstufe innerhalb der letzten 10 Sekunden, 1 Minute nach, 3 Minuten nach,

5 Minuten nach, 10 Minuten nach und 15 Minuten nach Ende der Belastung aus dem hyperämisierten Ohrläppchen durchgeführt. Die Laktatanalyse erfolgte schnellst möglich nach der letzten kapillären Blutentnahme. Die spirometrische Gasanalyse erfolgte kontinuierlich im 10 Sekunden-Rhythmus aus der ausgeatmeten Luft ab der 6. Minute vor Belastung bis zur 10. Minute nach Ende der Belastung. Dazu trugen die Probanden eine Atemmaske, die über einen Probeschlauch mit einem spirometrischen Analysesystem (Metalyser II®, Cortex, Leipzig, Germany) verbunden war.

Die anthropometrischen Daten und die Leistungsdaten werden in Kapitel 2.2.2.1 näher beschrieben und sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst. Die Bestimmungsmethoden von Interleukin-6 und CRP sind in Kapitel 2.3 dargestellt.

Abgeschlossen wurde das Validierungsverfahren durch die Teilnahme an einem Ringversuch von Instand e.V.. Diese Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien führt regelmäßig Zielwertermittlungen in der externen Qualitätssicherung durch. Aufgrund der geringen Stabilität von Interleukin-6 ist der Probenversand und damit die Teilnahme am Ringversuch nur für CRP möglich gewesen.

2.2.1.2 Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme

Für den Vergleich der kapillären mit der intravenösen Plasmagewinnung wurden 205 Probanden zeitgleich aus der Ellenbeuge intravenös und aus dem hyperämisierten Ohrläppchen kapillär Blut entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten standardisiert. Die geringe Probenmenge ließ keine Referenzmethodenmessung für Interleukin-6 und CRP zu. Mit geeigneten statistischen Verfahren wurde auf Gleichheit der Proben getestet (siehe Kapitel 2.4).

2.2.1.3 Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetiken; CRP-Vollblut-Bestimmung

In diesem Studienabschnitt wurde die belastungsinduzierte Kinetik der CRP- und IL-6-Konzentration in zwei Studien untersucht. Zusätzlich wurden CRP-Ruhewerte vor der Belastung, die mit Hilfe einer kapillären Vollblutmethode gemessen wurden, mit den Ergebnissen der kapillären und intravenösen Plasma-CRP-Bestimmungsmethode verglichen.

Die belastungsinduzierte CRP-Kinetik wurde mit Hilfe einer Studie untersucht, bei der 20 Probanden eine 90 minütige Laufbandbelastung absolvierten. Die Blutentnahmen für die CRP-Bestimmungen erfolgten unmittelbar vor der Belastung, sofort nach der Belastung, 45 Minuten nach Belastungsende, 2 Stunden nach Belastungsende und 24 Stunden nach

Belastungsende. Die anthropometrischen Daten und die Leistungsdaten sind in den Tabellen 10 und 11 dargestellt.

Für die Untersuchung der IL-6-Kinetik absolvierten 15 Probanden eine Fahrrad-liegend-Spiroergometrie. Das Belastungsprotokoll beinhaltete zunächst eine niedrigstufige Vorbelastungsphase mit 3 Stufen für je 5 Minuten mit 10, 30 und 50 Watt. Danach erhöhte sich die Stufenbelastung in 25 Watt-Schritten mit einer Stufendauer von je 3 Minuten bis zur subjektiven Erschöpfung. Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit wurden Kapillarproben zur Laktatanalyse entnommen und spirometrische Gasanalysen, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Leistungsdaten sind in Tabelle 13 dargestellt. Die kapillären Blutentnahmen für die IL-6-Bestimmung erfolgten vor der Belastung am Ende der 50 Watt-Stufe, 1 Minute nach der Belastung und 45 Minuten nach der Belastung.

Die Blutentnahmen für den CRP-Methodenvergleich wurden vor der Belastung im Liegen intravenös aus der Ellenbeuge und kapillär aus dem hyperämisierten Ohrläppchen im Rahmen der IL-6-Kinetik-Studie entnommen.

2.2.2 Probanden

2.2.2.1 Studienabschnitt A: Belastungsstudie mit Methodenvergleich

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena geprüft und genehmigt. Es gab insgesamt 45 Studienteilnehmer. Davon waren 18 Probanden Patienten mit einer klinisch erfassten Major-Depression, die restlichen 27 stellten die Kontrollpersonengruppe dar.

Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patienten mit Major-Depression wurden in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie stationär oder ambulant behandelt und vor Ort um Teilnahme an der Studie gebeten.

Die Personen aus dem Kontrollkollektiv hatten bereits an anderen Studien mit psychiatrischen Fragestellungen teilgenommen hatten oder hatten schon am Studienabschnitt B teilgenommen. Alle Probanden wurden am Belastungstag auf Sporttauglichkeit untersucht, anamnestisch erfasst und befragt. Probanden mit akuten Infekten, Hypertonie oder kardialen Auffälligkeiten im Ruhe-EKG wurden von der Studie ausgeschlossen.

Anthropometrische Daten

Das Probandenkollektiv setzte sich aus 33 Frauen und 12 Männern ($n = 45$) zusammen. Das Durchschnittsalter lag bei 40 ± 12 Jahren. Ihre durchschnittliche Körperhöhe betrug 169 ± 8 cm und das durchschnittliche Körpergewicht lag bei 70 ± 12 kg (Tab. 7).

Die Körperfettmessung wurde nach der Methode von Parizkova, der Kalipermetrie (64) durchgeführt. Dabei erfolgte die Messung der Hautfaltendicke an 10 vorgeschriebene Körperstellen. Die Ermittlung der Körperhöhe und des Körpergewichtes erfolgte mit herkömmlichen Methoden, d.h. mit Waage und Bandmaß.

Die anthropometrischen Daten für die einzelnen Probanden dieses Studienabschnittes sind im Anhang in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 7: Anthropometrische Daten der Probanden aus dem Studienabschnitt A, MW \pm Stabw

	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI	Körperfett (%)
Mittelwert \pm Standardabweichung	$39,9 \pm 12,0$	$70,2 \pm 12,0$	$1,69 \pm 0,08$	$24,5 \pm 4,2$	$17,9 \pm 4,7$

Gesundheits- und Leistungsdaten

Vor Beginn der Belastung wurde eine Gesundheitsbeurteilung der Studienteilnehmer durchgeführt. Diese Eingangsuntersuchung bestand aus einer Anamnese und einer klinisch körperlichen Untersuchung mit Ruhe-EKG und Ruheblutdruckmessung.

Wurden bei der Gesundheitsbeurteilung keine Auffälligkeiten entdeckt, absolvierten die Probanden eine stufenförmig ansteigende Fahrradspiroergometrie bis zur subjektiven Erschöpfung. Zuvor erfolgte eine intravenöse Blutentnahme zur Analyse des Blutbildes und der Entzündungsparameter. Der Belastungstest in Verbindung mit der Bestimmung der Individuellen anaeroben Schwelle (IAS) nach Stegmann et al. (85) diente der Ermittlung der submaximalen und maximalen Leistungsfähigkeit. Die Studienteilnehmer begannen mit einer Eingangsbelastung von 25 Watt. Die Ergometrie wurde dann mit einer Leistungssteigerung von 25 Watt nach jeder 3. Minute bis zur subjektiven Erschöpfung fortgeführt. Die Probanden wurden im Ergometrielabor unter standardisierten Bedingungen (Temperatur, Luftdruck) belastet. Die wichtigsten Zielparameter zur Beurteilung der individuellen Leistungsfähigkeit bei diesem Test waren: maximale Leistung, maximale Herzfrequenz, maximales Laktat im Blutplasma und maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2peak}). Mit Hilfe des Spirometers (MetaLyser II, Cortex) konnte während der Ergometrie kontinuierlich die Sauerstoffaufnahme bzw. die Kohlendioxidabgabe sowie weitere wichtige spirometrische Parameter zur Gesund-

heits- und Leistungsbeurteilung gemessen werden. Des Weiteren dokumentierte das Belastungs-EKG die Herzfrequenz am Ende jeder Belastungsstufe. Kapillarblutprobenentnahmen erfolgten in Ruhe, am Ende jeder Stufe, sofort nach der Belastung, sowie 1, 3, 5, 10 und 15 Minuten nach Abbruch des Testes. Die Hyperämisierung des entsprechenden Ohrläppchens mit Finalgon (Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Deutschland) einige Minuten vor Testbeginn gewährleistete einer fehlerfreie Laktatentnahme. Vor dem Anstechen mit einer Lanzette entfernte der Laktatentnehmer die Salbe von dem Ohrläppchen mit einem alkoholgetränkten Tupfer. Nach Aufnahme des Blutes in eine 20µl Glaskapillare (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), erfolgte die sofortige Überführung dieser Probe in ein speziell präpariertes Messröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und nach der letzten Blutentnahme einer Belastung die Messung am Automaten. Der Belastungsabbruch erfolgte dann, wenn der Proband seine subjektive Belastungsgrenze erreicht hatte. Der gesamte Ergometrieverlauf wurde exakt protokolliert. Die ermittelten Laktatkonzentrationen ermöglichten die Erstellung einer Laktat-Leistungskurve, so dass die Leistung an der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) in Watt ermittelt werden konnte. Die mit Hilfe der Fahrradspiroergometrie gewonnenen Leistungsdaten, lassen wichtige Schlussfolgerungen über den Gesundheitszustand, die Leistungsfähigkeit und die Belastbarkeit der Studienteilnehmer zu. Wichtige Parameter hierfür sind die maximale Leistungsfähigkeit und die maximale Sauerstoffaufnahme, für deren Beurteilung es geschlechts- und altersspezifische Normwerttabellen gibt. Mittelwerte und Standardabweichung der Leistungsdaten für die Probanden sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Leistungsdaten für die einzelnen Probanden dieses Studienabschnittes sind im Anhang in Tabelle 36 aufgeführt.

Tabelle 8: Leistungsparameter im fahrradergometrischen Stufentest

Parameter	MW \pm Stabw
VO _{2max} [ml min ⁻¹ kg ⁻¹]	2614 \pm 711
Herzfrequenz _{max} [Hz]	181 \pm 14
Herzfrequenz _{IAS} [Hz]	147 \pm 16
Laktat _{max} [mmol l ⁻¹]	8,8 \pm 2,4
Laktat _{IAS} [mmol l ⁻¹]	3,3 \pm 0,7
Leistung _{max} [W]	156 \pm 49
Leistung _{IAS} [W]	105 \pm 36
Leistung _{relativ} [W kg ⁻¹]	1,6 \pm 0,52

2.2.2.2 Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme

In diesem Studienabschnitt gab es keine Ein- und Ausschlusskriterien für Probanden, da diese nicht belastet wurden. Um ein möglichst großes Spektrum von CRP- bzw IL-6-Ruhewerte überprüfen zu können, wurden alle Personen zu den Blutentnahmen akquiriert, die zum Bekanntenkreis der Studie durchführenden Mitarbeiter gehörten. Am Untersuchungstag füllten die Probanden vor der Blutentnahme die Einverständniserklärung und einen Fragebogen aus. Danach wurden die anthropometrische Messungen durchgeführt.

Anthropometrische Daten

Zunächst wurden das Körpergewicht, die Körperhöhe, der Bauch- und Hüftumfang mit Hilfe einer geeichten Waage und eines Bandmaßes sowie der Körperfettanteil nach der bereits erwähnten Methode von Parizkova bestimmt. Der Bodymass-Index und die Waist-to-Hip-Ratio wurden errechnet. Die Teilnehmergruppe setzte sich aus 86 Frauen und 119 Männern ($n = 205$) zusammen. Das Durchschnittsalter für die Gesamtgruppe lag bei 30 ± 13 Jahren. Ihre durchschnittliche Körperhöhe betrug 175 ± 10 cm und das durchschnittliche Körpergewicht lag bei $72,8 \pm 12,6$ kg. Tabelle 9 zeigt die anthropometrischen Daten für die Gesamtgruppe und geschlechtsspezifisch differenziert. Die genauen anthropometrischen Daten für jeden Probanden sind im Anhang (Tabelle 37) aufgelistet. Aus Gründen des Datenschutzes wurden die Namen der Probanden anonymisiert.

Tabelle 9: Anthropometrische Daten der Probanden aus dem Studienabschnitt B, MW \pm Stabw

	Anzahl	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg m ⁻²]	Körperfett (%)	Waist-to-Hip
Frauen	86	$30,5 \pm 13,4$	$63,3 \pm 10,0$	$166 \pm 5,8$	$22,84 \pm 3,24$	$15,7 \pm 4,8$	$0,78 \pm 0,06$
Männer	119	$30,2 \pm 12,2$	$79,6 \pm 9,6$	$181 \pm 7,6$	$24,18 \pm 2,45$	$13,3 \pm 3,6$	$0,87 \pm 0,05$
Gesamt	205	$30,3 \pm 12,7$	$72,8 \pm 12,6$	$175 \pm 10,1$	$23,62 \pm 2,88$	$14,3 \pm 4,3$	$0,83 \pm 0,07$

Nach der Anthropometrie wurden die Blutentnahmen wie im Kapitel 2.3 beschrieben durchgeführt.

2.2.2.3 Studienabschnitt C: Belastungsstudien zur Messung der CRP- und IL-6-Kinetik .Methodenvergleich CRP-Serum- versus CRP-Vollblutmethode

Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Plasmahalbwertszeiten von CRP und IL-6 im Serum während und nach Belastungen, wurden 2 Studien durchgeführt. Die CRP- Kinetik wurde mit Hilfe einer 90-minütige Laufbandbelastung untersucht. Die IL-6-Ausschüttung

wurde durch eine Fahrradliegend-Spiroergometrie induziert. In dieser zweiten Studie wurden die kapillären Ruheblutentnahmen zum CRP-Vollblut- versus CRP-Serum-Methodenvergleich mit durchgeführt.

Anthropometrische Daten CRP-Kinetik-Studie

In der CRP-Kinetik-Studie waren 20 klinisch gesunde Männer (26 ± 4 Jahre; 182 ± 7 cm; 78 ± 7 kg) die Versuchspersonen. Tabelle 9 stellt die anthropometrischen Daten der Probanden dar, die an der IL-6-Kinetik-Studie teilnahmen. Das Teilnehmerkollektiv bestand aus 3 Frauen und 12 Männern.

Leistungsdaten CRP-Kinetik-Studie

Die Leistungsdaten zur Gesundheitsbeurteilung, ermittelt durch einen Fahrradstufentest, sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Leistungsdaten; fahrradergometrischer Stufentest der Probanden

N	Rel. HV [ml/kg]	Rel. VO _{2peak} [ml/min/kg]	P _{max} [W]	P _{IAS} [W]	P _{IAS} [W/kg]	La _{IAS} [mmol/l]	HF _{IAS} [1/min]
20	$11,3 \pm 1,3$	51 ± 7	302 ± 34	179 ± 47	$2,32 \pm 0,62$	$2,94 \pm 0,7$	147 ± 2

Zur Bestimmung der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) für die Hauptbelastung wurde ein Laufbandstufentest durchgeführt. Ausgangsbelastung war 2m/s. Nach 3 Minuten wurde jeweils die Laufgeschwindigkeit um 0,5 m/s erhöht bis zur subjektiven Erschöpfung. Am Ende jeder Stufe erfolgte die kapilläre Blutentnahme zur Laktatbestimmung. Die Berechnung der IAS erfolgte nach Stegmann und Kindermann 1981 (85). Tabelle 11 zeigt die Leistungsdaten der Probanden, die mit dem Laufbandstufentest ermittelt wurden.

Tabelle 11: Leistungsdaten der Laufbandergometrie

N	IAS				Peak			
	P	La	HF	P 80%	P	La	HF	Rel. VO _{2peak}
	[m/s]	[mmol/l]	[1/min]	[m/s]	[m/s]	[mmol/l]	[1/min]	[ml/min/kg]
20	$3,4 \pm 0,4$	$3,5 \pm 1,0$	171 ± 11	$2,7 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,5$	$11,8 \pm 2,2$	196 ± 6	60 ± 7

Anthropometrische Daten IL-6-Kinetik-Studie

Die anthropometrischen Daten der Studienteilnehmer sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Anthropometrische Daten der Probanden aus dem Studienabschnitt C: IL-6-Kinetik, MW \pm Stabw

	Anzahl	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg m ⁻²]	Körperfett (%)	Waist-to- Hip
Frauen	3	24,0 \pm 1,4	57,7 \pm 1,2	166 \pm 6	20,90 \pm 1,61	13,6 \pm 1,1	0,75 \pm 0,02
Männer	12	24,2 \pm 1,4	71,4 \pm 6,7	177 \pm 4	22,84 \pm 1,98	12,0 \pm 2,9	0,83 \pm 0,02
Gesamt	15	24,0 \pm 1,4	68,7 \pm 8,2	175 \pm 6	22,45 \pm 2,02	12,3 \pm 2,6	0,81 \pm 0,04

Leistungsdaten IL-6-Kinetik-Studie

Aus der Fahrradliegend-Spiroergometrie, die die IL-6-Ausschüttung induzieren sollte, wurden auch die Leistungsdaten ermittelt. Tabelle 13 stellt die Leistungsdaten in der Übersicht dar.

Tabelle 13: Leistungsdaten; fahrradliegend spiroergometrischer Stufentest der Probanden

N	VO _{2peak} [l/min/kg]	HF _{max} [1/min]	HF _{IAS} [1/min]	La _{max} [mmol/l]	La _{IAS} [mmol/l]	P _{max} [W]	P _{IAS} [W]	P _{IAS} [W/kg]
15	3,03 \pm 0,61	185 \pm 11	152 \pm 12	11,01 \pm 2,1	3,87 \pm 1,8	224 \pm 42	150 \pm 33	3,26 \pm 0,42

Der Vergleich der CRP-Bestimmungsmethoden erfolgte aus kapillären Ruheblutentnahmen dieser Studie.

2.3 Labormethoden

Die Beschreibung der Labormethoden umfasst die Probengewinnung und -verarbeitung sowie das Protokoll der CRP- und IL-6-Analyse.

2.3.1 Probengewinnung und -verarbeitung

Da CRP und IL-6 relativ stabile Plasmaparameter sind, ist die Präanalytik relativ einfach. Alle Blutentnahmen und Verarbeitungsschritte erfolgten standardisiert und werden im Folgenden detailliert beschrieben. Die Blutentnahmezeitpunkte wurden bereits im Kapitel 2.2.1 beschrieben.

Studienabschnitt A

Die Blutproben wurden den Probanden vor der Belastung im Liegen und unmittelbar nach der Belastung auf dem Fahrrad sitzend entnommen. Die Blutentnahme erfolgte immer aus einer Vene der Ellenbeuge mit einer 20 G Kanüle (Sarstedt) bei leichter Stauung. Es wurde 1 Röhrchen mit 9 ml EDTA-Plasma und 3 Röhrchen mit jeweils 9 ml Serum (Sarstedt) in standardisierter Reihenfolge entnommen. Zuerst wurde ein Serum-Röhrchen befüllt, danach

ein EDTA-Plasma-Röhrchen und zum Schluss wieder zwei Serum-Röhrchen. Um eine schnellstmögliche Weiterverarbeitung zu gewährleisten, wurden die Proben sofort zum Labor gebracht und für 10 Minuten bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Plasma bzw. Serum wurde in 0,5 ml Probenröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aliquotiert und bei -85°C tief gefroren und bis zur Analyse gelagert.

Studienabschnitt B

Die kapilläre und intravenöse Blutentnahme erfolgten zeitgleich innerhalb weniger Minuten im Liegen unter standardisierten Bedingungen (10 Minuten liegen, bis 30 Minuten vor der Blutentnahme keine körperliche Aktivität). Zur Vorbereitung der kapillären Blutentnahme wurde ein Ohrläppchen mit Hilfe von Finalgon® (Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Deutschland) hyperämisiert. Nach einigen Minuten wurde das Ohr mit einem alkoholgetränkten Tupfer von der Salbe befreit und mit einer Lanzette angestochen. Es wurden ca. 1 ml Blut in ein EDTA-Kapillarblut-Röhrchen (Sarstedt) aufgenommen. Auf der gegenüberliegenden Seite des Probanden erfolgte gleichzeitig die Punktion einer Vene aus der Ellenbeuge. Es wurden 2,6 ml Blut-EDTA-Röhrchen (Sarstedt) abgenommen. Die Proben wurden schnellst möglichst zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert. Die Röhrchen wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben zentrifugiert, das Plasma aliquotiert und bis zur Analyse tiefgefroren.

Studienabschnitt C: IL-6-Kinetik

Für die Beschreibung der IL-6-Kinetik wurde wie eben beschrieben aus den hyperämisierten Ohrläppchen der Probanden 1 ml Blut in ein EDTA-Kapillarblutröhrchen aufgenommen.

Studienabschnitt C: CRP-Kinetik

Die intravenösen Blutentnahmen zur Beschreibung der CRP-Kinetik waren unmittelbar vor der Belastung, sofort nach der Belastung, 45 Minuten nach Belastungsende, 2 Stunden nach Belastungsende und 24 Stunden nach Belastungsende. Die Punktion der Vene und die Weiterverarbeitung der Proben sind in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben.

Studienabschnitt C: CRP-Plasma versus CRP-Vollblut

Für die CRP-Vollblut-Bestimmungsmethode wurde Kapillarblut - genau wie für die Laktatanalyse - in eine 20 µl Glaskapillare aufgenommen, sofort mit 2 ml Diluent verdünnt und bei -80°C tiefgefroren. Die Blutentnahme für die Messung von Plasma-CRP erfolgte ebenfalls kapillär, wobei 1 ml Blut in ein EDTA-Kapillarblutröhrchen aufgenommen, zentrifugiert und nach Plasmagewinnung bei -80° C gelagert wurde.

2.3.2 Probenmessungen

Die Original- und Referenzbestimmungsmethode wurde bereits in Tabelle 6 auf Seite 16 für CRP und IL-6 im Überblick dargestellt.

2.3.2.1 Interleukin-6 Bestimmung

Photometrischer 2 Schritt-Sandwich-ELISA

Zur Bestimmung des Interleukin-6 wurde ein Bioassay nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA entwickelt. Typischer Weise besteht ein solches Analysesystem aus einem antigenspezifischen Capture (=Fang)-Antikörper, dem Probenantigen, dem Enzym-konjugierten Detektorantikörper, dem Chromogen und der Stopplösung. Zunächst wird der Capture-Antikörper nonkovalent an das Sorbens (= Mikrotiterplatte) gebunden. Er fixiert das Probenantigen, an das sich schließlich der mit einem Enzym-konjugierten Detektor-Antikörper spezifisch anlagert. Das Enzym am Detektor-Antikörper katalysiert eine Reaktion, bei der ein Profarbstoff (= Chromogen) in einen detektierbaren Farbstoff umgewandelt wird. Die Farbintensität ist direkt proportional der Anzahl gebundener Antigenmoleküle und damit zur Quantifizierung der Antigenkonzentration in der Probe geeignet (38, 68).

In der Studienvorbereitungsphase wurde der IL-6-ELISA optimiert. Um eine ausreichend hohe Sensitivität des Testsystems zu erreichen, ist es notwendig die Konzentration der Antikörper, der Standards, der Verdünnungslösungen usw. zu variieren (siehe Kapitel 3.1.1). Das Ziel dieser Optimierungsmaßnahmen war die Erstellung einer exakten detailliert beschriebenen Arbeitsanleitung für die IL-6-Analysen im Studienabschnitt A und B. Diese Verfahrensvorschrift gliedert sich in folgende Arbeitsschritte:

- I. Beschichten der Platten mit dem Capture-Antikörper
- II. Blocken und Pipettieren der Standards, Kontrollen und Proben
- III. Pipettieren des biotinylierten Detektor-Antikörpers
- IV. Pipettieren der Streptavidin-Meerettich-Peroxidase
- V. Pipettieren des Chromogens
- VI. Messen am Fotometer / Plausibilitätskontrolle / Auswertung

Zwischen diesen Arbeitsschritten sind bestimmte Inkubationszeiten und eine determinierte Anzahl von Waschschritten einzuhalten. Die genaue Arbeitsanleitung ist im Anhang angefügt bzw. im Ergebnisteil des ersten Studienabschnittes näher beschrieben. Diese Verfahrensvorschrift war die Grundlage für alle IL-6-Analyse-Protokolle im Studienabschnitt B. Die einzelnen Protokolle wurden chronologisch in Form von gebundenen Laborbüchern

archiviert. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Im Ergebnisteil dieser Dissertation (Kapitel 3) sind die Resultate der Optimierungsmaßnahmen dargestellt und ergänzen somit den Methodenteil.

Chemiluminensenz-1-Schritt-Sandwich-ELISA

Abbildung 3 zeigt das Reaktionsschema des Chemiluminensenz-1-Schritt-Sandwich-ELISA zur IL-6-Konzentrationsbestimmung im Blutplasma.

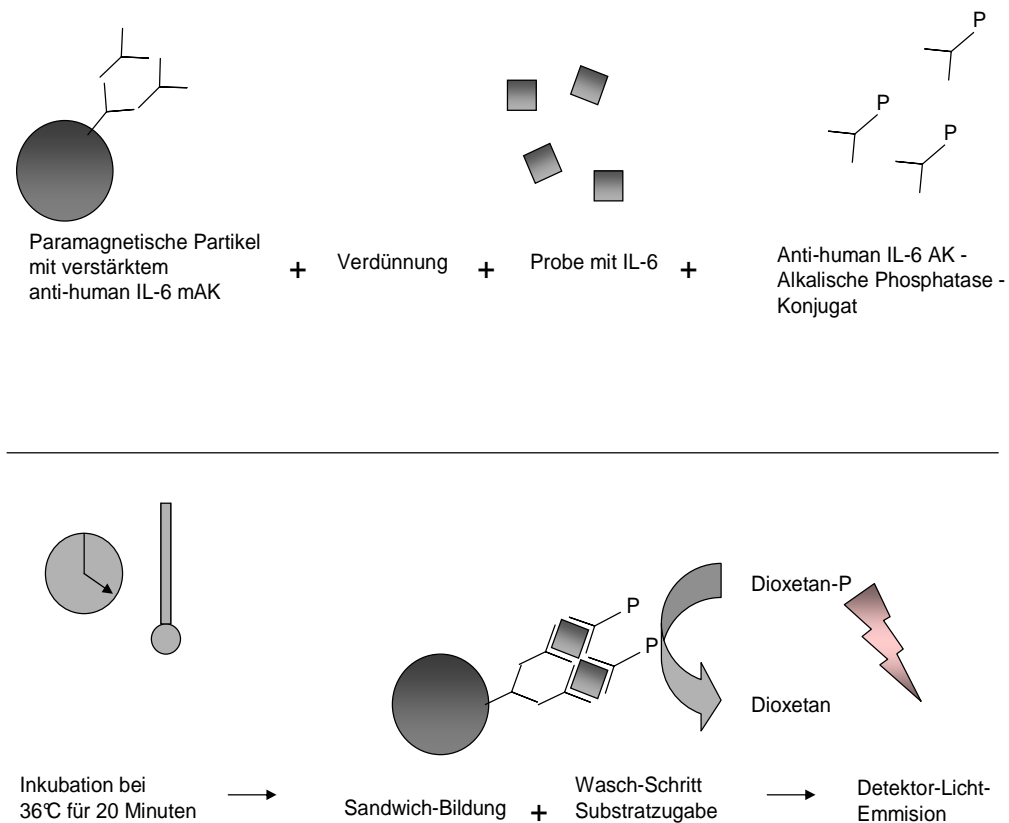


Abbildung 3: Arbeitsschritte bei der automatisierten IL-6-Bestimmung am ACCESS® der Firma Beckman-Coulter. Da alle Testantikörper und die Proben in einem Arbeitsschritt zugefügt werden, handelt es sich um einen 1 Schritt-Sandwich-ELISA.

Als Referenzmethode für die IL-6-Bestimmung im Studienabschnitt A wurde ein automatisierter Chemilumineszenz-Immunoassay mit Magnetpartikeltechnologie mit der Bezeichnung „Access® IL-6“ (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) benutzt. Der Messbereich dieses Tests liegt zwischen 0,5 und 1500 pg/ml. Die Kalibratoren waren gebrauchsfertig und evaluiert nach NIBSC/WHO Standard 89/548. Das Probenvolumen betrug 110 µl. Nach Probenprogrammierung und -pipettierung dauerte der Test ca. 35 Minuten bis

zum ersten Ergebnis. Wegen der Vergleichbarkeit mit der photometrischen IL-6-ELISA-Messung wurden im Studienabschnitt A Doppelbestimmungen durchgeführt.

Im Studienabschnitt C wurde die belastungsinduzierte IL-6-Kinetik mit Hilfe dieses Chemiluminenszenz-1-Schritt-Sandwich-ELISA und nicht mit dem photometrischen ELISA bestimmt.

2.3.2.2 C-reaktives-Protein-Bestimmung

2-Schritt-Sandwich-ELISA

Das Testsystem des von uns eingesetzten CRP-ELISA ist genau wie der IL-6-ELISA nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut (siehe Kapitel 3.3.2.1). Der Testverlauf ist zeitlich gesehen kürzer, weil der Detektor-Antikörper bereits mit dem farbstoffbildenden Enzym konjugiert ist, so dass die Streptavidin-Biotin-vermittelte Anbindung des Enzyms an den Detektorantikörper entfällt. Die Inkubationszeiten beim CRP-ELISA sind insgesamt kürzer, als beim IL-6-ELISA. Dafür sind die CRP-Probenvorbereitungsmaßnahmen erheblich umfangreicher, weil die Konzentration von Plasma-CRP im $\mu\text{g/ml}$ -Bereich liegt. Deshalb mussten die Proben in der Vorbereitung in zwei Pipettierschritten für den Test 2000 fach verdünnt werden. Im Vergleich dazu liegt die IL-6-Plasmakonzentration im pg/ml -Bereich. Die wichtigsten Arbeitsschritte der Verfahrensvorschrift können wie folgt beschrieben werden:

- I. Beschichten der Platten mit dem Capture-Antikörper
- II. Blocken und Pipettieren der Standards, Kontrollen und Proben
- III. Pipettieren des Enzym-konjugierten Detektor-Antikörpers
- IV. Pipettieren des Chromogens
- V. Messen / Plausibilitätskontrolle / Auswertung

Beim CRP-ELISA wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Kinetische Immunnephelometrie

Die Referenzmessung für unser CRP-ELISA-System wurde von einem externen kommerziellen Klinisch-Chemischen-Labor (Laborgemeinschaft Kretschmar-Nichterlein, Erfurt) durchgeführt. Bei diesem CRP-Test wird die Geschwindigkeit der Streulichtzunahme am Automaten gemessen. Die Streulichtzunahme wird verursacht von in Lösung schwebenden Partikeln. Diese Partikel entstehen durch die Komplexbildung während einer Antigen-Antikörper-Reaktion (siehe Abbildung 4). Das Testsystem besteht aus einer CRP-

Reagenzienkartusche mit Antikörper, dem IMAGE®-Immunchemieanalyser (Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland) und dem Kalibrator 5 Plus.

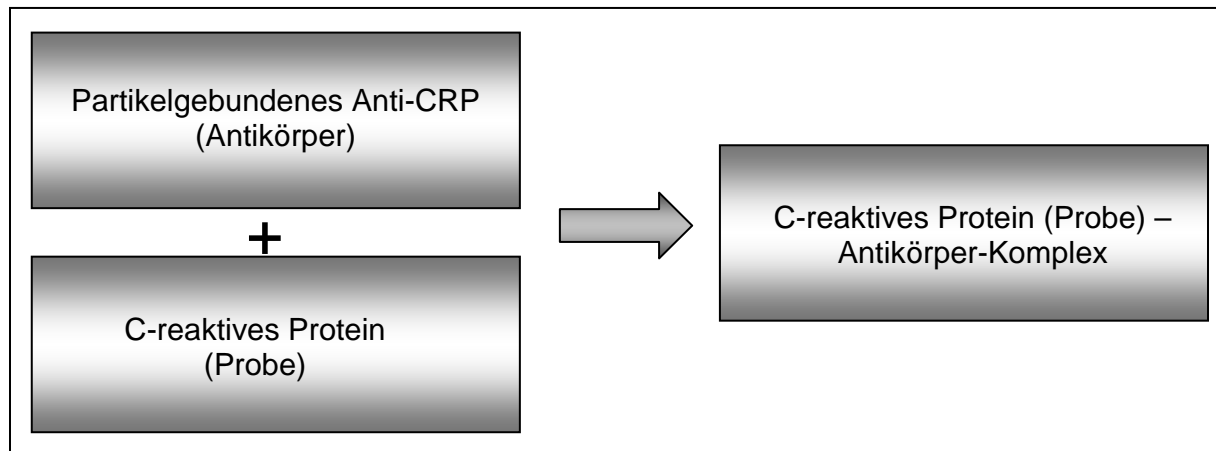


Abbildung 4: Reaktionsschema CRP-Nachweis durch kinetische Immunnephelometrie

2.3.2.3 Laktatbestimmung

Die submaximale Leistungsfähigkeit wurde mit Hilfe des standardisierten Stufentests, der Laktat-Leistungskurve und der Bestimmung der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) nach Stegmann und Kindermann (1981) ermittelt (siehe Kapitel 2.2.2.1) (85). Die Laktatmessung erfolgte durch LOD-Amperometrie am Ebio basic (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Bei dieser Methode katalysiert membranfixierte Laktatoxidase die Umwandlung von in der Probe enthaltenem Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid. Im zweiten Schritt oxidiert Wasserstoffperoxid an einer Platinelektrode bei 600 mV. Der dabei resultierende Elektronenfluss wird in ein detektierbares Spannungssignal umgewandelt und ist proportional der Laktatkonzentration in der gemessenen Kapillarblutprobe.

2.4 Statistik

Studienabschnitt A

Bei der Methodenetablierung im Studienabschnitt A wurde die Zuverlässigkeit der quantitativen Messung von CRP und Interleukin-6 mit Hilfe der typischen Validierungsparameter Sensitivität, Inter- und Intraassay-Präzision sowie Wiederfindung überprüft. Mittelwert (arithmetisches Mittel), Standardabweichung und Variationskoeffizient der Messreihen waren dabei die zu Grunde liegenden statistischen Prüfgrößen und wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 11.0 (Redmond, USA) ermittelt. Die deskriptive Statistik ist in den Tabellen und in den Abbildungen dargestellt. Dabei wurden

Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (Stabw) aufgeführt. Die einzelnen statistischen Berechnungen für die ELISA-Entwicklung wie z.B. Präzisionsmessungen, Wiederfindung und Sensitivität sind im Ergebnisteil an gegebener Stelle aus Übersichtsgründen noch einmal konkret erläutert.

Zusätzlich fand im Studienabschnitt A ein Methodenvergleich der CRP- und Interleukin-6-Konzentrationsmessung im Plasma statt. Nach der Rohdatenbereinigung der ermittelten CRP-Werte erfolgte die Überprüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Weil einzelne Messwerte wegen der geringeren Sensitivität der CRP-Referenzmethode nicht ermittelt werden konnten, musste vor der statistischen Analyse eine Datenreduktion vorgenommen werden. Näheres ist dazu in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Es wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

Bei der IL-6-Bestimmung lagen einzelne Messwerte außerhalb des Messbereiches, so dass auch hier eine Rohdatenbereinigung vorgenommen werden musste. Es wurde eine ANOVA (Zeitpunkt x Methode) mit Messwiederholung angewendet. Zudem erfolgte eine Überprüfung der Sphärizität und eine Greenhouse-Geisser-Korrektur. Anschließend wurde der Post hoc Test nach Tukey HSD durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, USA).

Studienabschnitt B

Zur Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte zunächst wieder die Verwendung vom Kolmogorov-Smirnov-Test. Danach wurde der nichtparametrischer Wilcoxon Test für verbundene Stichproben angewandt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, USA). Mit Berechnung des Intraclass Correlation Coefficient (ICC) wurde auf Korrelation der Proben getestet. Für die Auswertung des ICC wurde die Software SPSS 16 (SPSS GmbH, München) verwendet. Bei der Rohdatenbereinigung von IL-6 wurden methodisch bedingte Ausreißer von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen.

Studienabschnitt C

Im Studienabschnitt C wurden belastungsinduzierte Konzentrationsänderungen von CRP und IL-6 im Plasma untersucht. Drei Messwerte konnten im Rahmen der IL-6-Kinetik-Messungen technisch bedingt nicht ermittelt werden und wurden deshalb durch den Mittelwert ersetzt. Es erfolgte wie in den anderen Studienabschnitten die Überprüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Für die Überprüfungen auf Signifikanz wurde ein t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

Zur Analyse der CRP-Vollblutmethode kam eine ANOVA mit Messwiederholung und der Post-hoc-Test nach Duncan zum Einsatz.

Für die Auswertung wurde die Software Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, USA). verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Studienbschnitt A

3.1.1 ELISA-Entwicklung

Im Ergebnisteil der IL-6- und CRP-ELISA-Entwicklung sind folgende Arbeitsschritte in chronologischer Reihenfolge dargestellt:

- I. Titrationen der Antikörper und der HPR-POD
- II. pH-Optimerung des Beschichtungsmediums
- III. Reduzierung der unspezifischen Bindungen
- IV. Optimierungen der Sensitivität und Präzision des jeweiligen Testsystems

Das Endergebnis ist eine Arbeitsanleitung, anhand derer auch ein an der Entwicklung des Testsystems unbeteiligter Laborant den Assay durchführen könnte. Diese Verfahrensvorschrift ist aber keineswegs endgültig und wird nach festgelegten Zeitintervallen der praktischen Anwendung einer Revision unterworfen, in denen die Anwender eventuelle Mängel beseitigen und Optimierungsmaßnahmen dem Protokoll zufügen. Ein Schema der ELISA-Entwicklung bis zur praktischen Anwendung ist in Abbildung 2 (siehe Abschnitt 2.2.1.1) dargestellt.

Der erste Schritt hierbei ist die Antikörpertitration, um die optimale Antikörperkonzentration für den gewählten Messbereich zu ermitteln. Dabei ist die Affinität des Antikörpers zu den Epitopen des Analyts entscheidend.

Eine Optimierung der Adhäsion des Coating-Antikörpers an die Oberfläche der Mikrotiterplatten kann über den direkten Vergleich von Beschichtungspuffermedien mit unterschiedlichem pH-Wert erreicht werden. Dazu werden gleiche Konzentrationen an Coating-Antikörper in Citrat-Puffer (pH = 5), in PBS-Puffer (pH = 7,0) und in Carbonat-Puffer (pH = 8,0) aufgenommen. Der Einfluss des pH-Wertes vom Beschichtungspuffer erfolgt durch direkten Standardkurvenvergleich.

Unspezifische Bindungen der verwendeten Testantikörper zu Serum- oder Plasmabestandteile wurden durch Zugabe von Harnstoff und Tween-20 in die Verdünnungsmedien für die Proben bzw. für die Standards, für die Detektorantikörper und für die HPR-POD unterdrückt. Die Wirkmechanismen für die Hemmung der unspezifischen Bindung für die einzelnen Diluentbestandteile sind in Tabelle 18 dargestellt. Tabelle 14 enthält zudem die wichtigsten variierbaren Parameter zur Optimierung eines ELISA.

Tabelle 14: Testbestandteile für optimale Sensitivität eines ELISA

Parameter	Variationsgrößen
Beschichtungspuffer	pH-Wert
Coating-Antikörper	Konzentration, Beschichtungsdauer, Beschichtungstemperatur
Probe	Menge, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur
Detektor-Antikörper	Konzentration, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur
Detektor-Diluent	BSA-, Tween-20-, Harnstoff-Konzentration
HPR-POD	Konzentration, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur
HPR-POD-Diluent	BSA-, Tween-20-, Harnstoff-Konzentration
Profarbstoff	Substratwahl (TMB oder ABTS), Inkubationsdauer

Für die Validierung eines ELISA sind vor allem folgende 4 Qualitätskriterien wichtig:

- Intra-Assay-Präzision (Wiederholungsmessungen einer Probe auf der gleichen Platte)
- Inter-Assay-Präzision (Messungen der gleichen Probe auf verschiedenen Platten)
- Sensitivität (definiert als die 2 fache Standardabweichung des Nullstandards)
- Wiederfindung oder Linearität (ausgedrückt durch den Pearson'schen Korrelationskoeffizienten)

3.1.1.1 Entwicklung und Optimierung des IL-6-ELISA

Antikörper-Titration

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen erfolgreichen Aufbau eines ELISA ist die richtige Auswahl des Antikörperpärchens und des Standardmaterials. Fertige kommerzielle IL-6-ELISA-Kits mit vorbeschichteten Platten haben den Nachteil, dass sie relativ unflexibel für spezielle sportmedizinische Fragestellungen sind. Die nicht sensitiven IL-6-Assays detektieren zwar meist bis zu mehreren Tausend pg IL-6/ml, aber sie erfassen nicht die IL-6-Ruhewerte von gesunden Sportlern. Die kommerziellen hoch sensitiven IL-6-ELISA messen sehr gut im Bereich bis 10 pg/ml, aber belastungsinduzierte IL-6-Anstiege im Plasma von Sportlern können nur über Verdünnungsstufen gemessen werden, was sehr umständlich ist. Aufgrund der speziellen Anforderungen des Messbereiches unserer Proben und aus Kostengründen, hatten wir uns für ein kommerzielles Antikörperpärchen der Firma BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) entschieden. Von der gleichen Firma wurde auch der Rohstandard bezogen.

Zunächst wurde eine Grob-Titration mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen nach dem Pipettierschema für eine komplette Mikrowellplatte in Abbildung 5 durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													ST0
B	C	o	a	t	i	n g	C	o	a	t	i	n g	ST1
C	K	o	n	z		1	K	o	n	z		2	ST2
D													ST3
E													ST0
F	C	o	a	t	i	n g	C	o	a	t	i	n g	ST1
G	K	o	n	z		3	K	o	n	z		4	ST2
H													ST3
	1	2	3				1	2	3				
	Detektor-Konzentration												

Abbildung 5: Grobtitrierung des IL-6-ELISA Antikörperpärchens. Es wurden 4 verschiedene Coating-Antikörper-Konzentrationen (0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,5 µg/ml) und 3 verschiedene Detektor-Antikörper-Konzentrationen (1,0 – 1,5 – 2,0 µg / ml) verwendet. Die IL-6-Standardkonzentrationen (ST0 bis ST3: 0 – 18,75 – 37,5 -75 pg/ml) blieben für alle Antikörperkombinationen gleich. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die von den Herstellern empfohlenen Capture-Antikörper-Konzentrationen liegen zwischen 0,1 und 10 µg/ ml. Das Beschichtungsvolumen wurde auf 100 µl pro Vertiefung in der Mikrotiterplatte festgelegt. Für den biotinylierte Detektor-Antikörper wird ein Konzentrationsbereich von 0,05 bis 2,0 µg/ ml empfohlen. Das Pipettivolumen von verdünntem Detektorantikörper pro Well war 100 µl. Das Verhältnis biotinylierter Detektorantikörper zu Streptavidin-HPR-POD (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) blieb bei allen verwendeten Detektorkonzentrationen gleich. Da sich im Laufe der Zeit die Bindungsaffinität der spezifischen Antikörper zum Antigen mindert, müssen die Antikörper nach ca. 6 Wochen nachtitriert werden. Das gleiche gilt, wenn eine neue Charge von Antikörperpärchen zum Einsatz kommt.

Tabelle 15 zeigt die bei der ersten Titration verwendeten Antikörper- und Standardkonzentrationen. Es wurden 4 verschiedene Capture-Antikörper- und 3 verschiedene Detektor-Antikörper-Konzentrationen verwendet. Die Standardkonzentrationen sollten den Bereich von belastungsinduzierten IL-6-Erhöhungen erfassen (0 bis 75 pg/ml).

Tabelle 15: Verwendete Antikörper- und Standardkonzentration für die erste Grobtitration

	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4
Capture-Antikörper	0,01 µg/ml	0,05 µg/ml	0,1 µg/ml	0,5 µg/ml
Detektor-Antikörper	1,0 µg / ml	1,5 µg / ml	2,0 µg / ml	-
Standard	0 pg/ml	18,75 pg/ml	37,5 pg/ml	75 pg/ml

Die Tabelle 16 zeigt das Ergebnis der Titration. Die Extinktionswerte der favorisierten Standardkurve sind rot beschriftet. Alle Standardkurven hatten ansteigende optische Dichten. Die höchsten Extinktionswerte wurden wie erwartet bei der höchsten Standardkonzentration gemessen. Werte für optische Dichten, die höher als 1,450 sind, stuft der benutzte Plattenreader (Dynatech, Boston, USA) als maximal ein. Solch hohe Resultate sind nicht mehr quantifizierbar. Auffallend ist, dass die niedrigste Konzentration des Capture-Antikörpers ausreichend ist für eine maximale Extinktion, während optische Dichten $> 1,450$ nur mit der höchsten Detektorkonzentration erreicht werden. Abbildung 6 zeigt die Gesamtheit der Standardkurven für die verschiedenen Antikörperkonzentrationskombinationen. Die favorisierte Standardkurve ist durch die kräftigere Linie hervorgehoben.

Tabelle 16: Optische Dichten der Standards für die verschiedenen Antikörperkonzentrations-Kombinationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Doppelbestimmung: K steht für Konzentration (siehe Tabelle 15). St. bedeutet Standard-Nummer. Die favorisierte Kombination ist rot markiert

Capt/ Det.	K1/ K1	K1/ K2	K1/ K3	K2/ K1	K2/ K2	K2/ K3	K3/ K1	K3/ K2	K3/ K3	K4/ K1	K4/ K2	K4/ K3
St.1	0,224	0,303	0,329	0,216	0,277	0,313	0,193	0,248	0,287	0,199	0,248	0,268
St.2	0,446	0,654	0,683	0,436	0,586	0,612	0,444	0,592	0,634	0,422	0,566	0,597
St.3	0,685	0,907	0,989	0,674	0,845	0,904	0,688	0,868	0,955	0,641	0,831	0,915
St.4	1,068	1,402	1,479	1,036	1,335	1,400	1,072	1,331	1,466	1,027	1,331	1,453

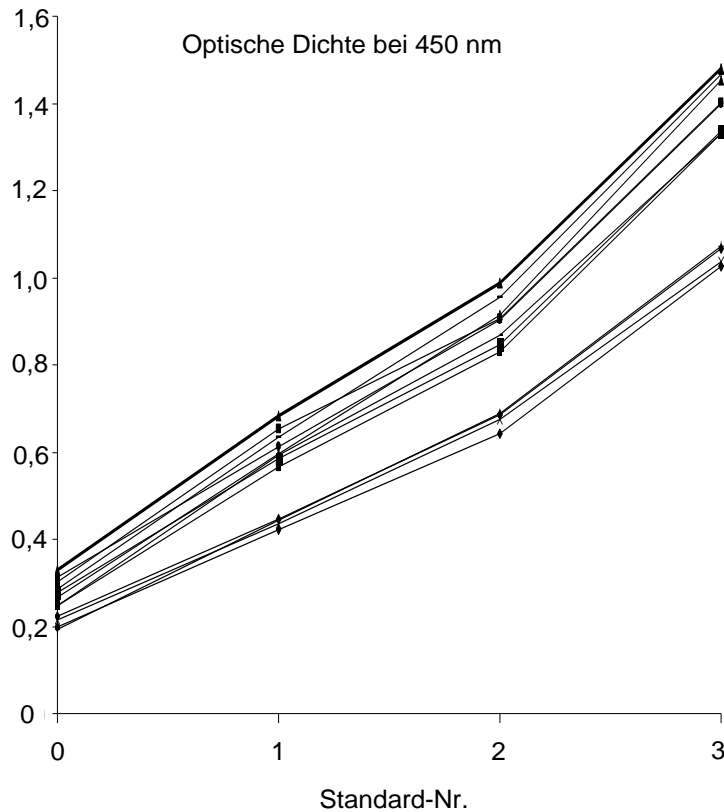


Abbildung 6: Gesamtheit der Standardkurven für die verschiedenen Antikörperkonzentrations-Kombinationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Doppelbestimmung: Die favorisierte Standardkurve ist die oberste der hier dargestellten Linien. Die y-Achse ist die optische Dichte bei 450 nm dargestellt. Die IL-6-Konzentrationen der Standardnummern wurden bereits in der Legende der Abbildung 5 genannt.

Das Ergebnis dieser ersten Titration war die Grundlage für das weitere Vorgehen bei der Optimierung des Testprotokolls. Tabelle 17 zeigt im Vergleich die erhaltene Standardkurve und die Anforderungskriterien, die eine Standardkurve eines ELISA laut Literatur erfüllen sollte.

Tabelle 17: Überprüfung der Ur-Standardkurve auf Erfüllung von Anforderungskriterien

Parameter	Anforderung an die O.D.'s	O.D.'s Urstandardkurve	Qualitative Bewertung	Maßnahme
Nullstandard	O.D. < 0,2	0,329	nicht erfüllt	Unspezifische Bindung hemmen
Standard 1	ST1/ ST2 >2	0,683/ 0,329 = 2,1	erfüllt	Keine Maßnahme notwendig
Standard 3	maximale O.D.	1,479	erfüllt	Keine Maßnahme notwendig

Der Nullstandard (ST0) sollte eine optische Dichte (O.D.) kleiner 0,2 haben. Der erste Standard (ST1) sollte etwa die doppelte optische Dichte wie der Nullstandard haben, der höchste Standard mindestens eine O.D. von 1,450 (nahezu maximal) (79). Die Tabelle 17

zeigt, dass der Nullstandard eine zu hohe Extinktion aufweist. Grund dafür war eine zu große unspezifische Bindung des Detektionssystems.

Optimierungsmaßnahmen weiterer Testkomponenten

Um die unspezifische Bindung zu minimieren, wurde ein Verdünnungsmittel für die Proben, den Detektor und die HPR-POD verwendet. Lösungsmittel war PBS. Die wirksamen Bestandteile und ihre Wirkmechanismen sind in Tabelle 18 aufgelistet. Die verwendeten Konzentrationen wurden z.T. der Literatur (Harnstoff, Tween-20) (104) entnommen und z.T. austitriert (BSA).

Tabelle 18: Zusammensetzung der Diluents für Proben, Detektor und HPR-POD

Inhaltsstoff	Konzentration	Wirkmechanismus
Tween-20	0,5 ‰	Netz- und Waschmittel: vermindert unspezifischer Anlagerungen an die Plattenoberfläche
BSA = Bovines Serumalbumin	3 %	Serumproteine treten in Konkurrenz mit der unspezifische Bindungsreaktion des Detektor-Antikörpers und der HPR-POD
Harnstoff	6 mM	mildes Protein-denaturierendes Reagenz: stört die niedrig-avide evt. unspezifische Antikörper-Antigen-Bindung, nicht aber die spezifische Bindung hoch-avider Antikörper-Antigen-Komplexe (82)

Auf die Darstellung der einzelnen Titrations wird an dieser Stelle verzichtet. Beispielhaft wird der Einfluss der Diluent-Zusätze auf die Standardkurve in Abbildung 6 dargestellt.

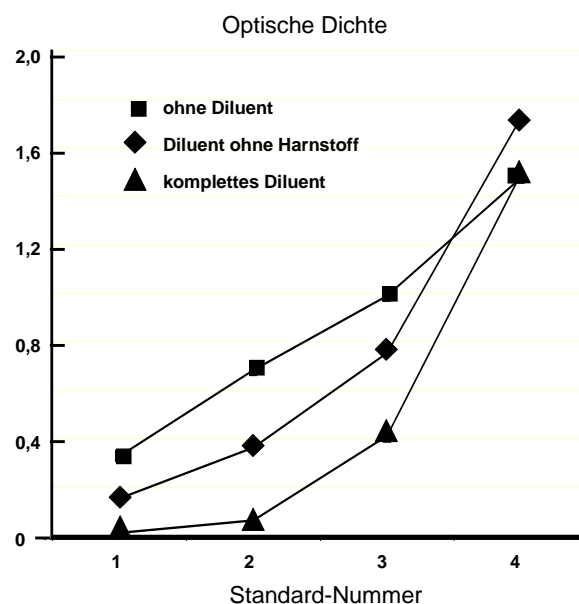


Abbildung 7: Der Einfluss des Diluents auf die Standardkurve. Bei der Verwendung des kompletten Diluents resultiert die geringste unspezifische Bindung, erkennbar an der niedrigsten optischen Dichte des Nullstandard bei 450 nm (y-Achse).

Des Weiteren wurde das Verhältnis biotinylierter Detektor-Antikörper und HPR-POD optimiert. Damit wurde verhindert, dass sich überschüssiges HPR-POD unspezifisch an die Platte anlagern kann. Tabelle 19 zeigt die Extinktionswerte der Standards nach Titrierung der HPR-POD bei konstanter Detektorkonzentration. Die favorisierte HPR-POD-Konzentration ist kursiv dargestellt. In diesem Falle ist ein deutlicher Anstieg der Extinktionswerte mit steigender Standardkonzentration zu verzeichnen, ohne dass der Nullstandard eine höhere optische Dichte als 0,2 hat.

Tabelle 19: Mittlere Extinktionen der Standards in Abhängigkeit von der HPR-POD-Konzentration. Die favorisierte HPR-POD-Konzentration ist kursiv dargestellt.

HPR-POD-Konz. [µl/ ml]	Standard 0 [o.D. bei 450 nm]	Standard 1 [o.D. bei 450 nm]	Standard 2 [o.D. bei 450 nm]	Standard 3 [o.D. bei 450 nm]
0,5	0,042	0,040	0,038	0,037
1,0	0,082	0,081	0,075	0,083
<i>1,5</i>	<i>0,098</i>	<i>0,118</i>	<i>0,131</i>	<i>0,185</i>
2,0	0,254	0,319	0,310	0,416

Zusätzlich wurde das Testsystem hinsichtlich des Einflusses der Inkubationsdauer und der Inkubationstemperatur für die Beschichtung, für die Proben-, die Detektor- und der HPR-POD-Bindung optimiert. Beispielhaft ist in Tabelle 20 der Einfluss der Detektorinkubationszeit auf die Standardkurve dargestellt. Die optimale Inkubationszeit ist wieder kursiv dargestellt und wurde in die Arbeitsanleitung integriert.

Tabelle 20: Mittlere Extinktionen der Standards in Abhängigkeit von der Detektorinkubationszeit. Die optimale Inkubationszeit ist kursiv dargestellt

Detektorinkuba- tions-Zeit [Stunden]	Standard 0 [o.D. bei 450 nm]	Standard 1 [o.D. bei 450 nm]	Standard 2 [o.D. bei 450 nm]	Standard 3 [o.D. bei 450 nm]
2	0,058	0,079	0,134	0,319
3	0,098	0,138	0,237	0,630
<i>4</i>	<i>0,118</i>	<i>0,227</i>	<i>0,426</i>	<i>1,216</i>

Nach Optimierung aller Variablen des IL-6-ELISA-Systems ergab sich folgende Arbeitsvorschrift als Endergebnis der Studienabschnittes A (die komplette Arbeitsanleitung für den IL-6-ELISA befindet sich im Anhang):

I. Beschichten der Platte

- 100 µl Coating-Lösung pro Well
- Inkubation über Nacht im Kühlschrank
- Platte ausklopfen
- 5 Minuten umgedreht stehen lassen
- noch einmal ausklopfen

II. Blocken der Platte

- 300 µl Blockpuffer pro Well,
- Inkubation 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Platte ausklopfen
- 5 Minuten umgedreht stehen lassen
- noch einmal ausklopfen

III. Waschschritt

- 3 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

IV. Pipettieren der Standards und Proben

- 100 µl Probendiluent pro Well
- 100 µl Standard bzw. Probe pro Well, Doppelbestimmung
- Inkubation über Nacht im Kühlschrank

V. Waschschritt

- 5 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

VI. Pipettieren des Detektors

- 100 µl Detektorlösung pro Well
- Inkubation 4 Stunden im Kühlschrank
- Beginn und Ende dokumentieren

VII. Waschschritt

- 5 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

VIII. Pipettieren der HPR-POD-Lösung

- 100 µl HPR-POD-Lösung in jedes Well.
- Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur

IX. Waschschritt

- 7 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

X. Substrat-Inkubation:

- 100 µl Chromogen in jedes Well,
- Inkubation für 30 - 60 Minuten auf dem Orbitalschüttler.
- Beginn und Ende dokumentieren

XI. Stoppen

- 100 µl Stopplösung in jedes Well

XII. Extinktionsmessung am Plattenreader bei 450 nm

Charakterisierung des Testsystems

Präzisionsmessungen

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden 2 Proben in unterschiedlichen Konzentrationen auf der gleichen Platte 24 mal gemessen. Zur Berechnung der Inter-Assay-Präzision (Tag-zu-Tag-Abweichung) wurden ebenfalls 2 Proben in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen an 24 unterschiedlichen Tagen gemessen. Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Intra- und Interassay-Präzisionsmessungen des IL-6-ELISA im hohen (high Level) und niedrigen Konzentrationsbereich (low Level). Vk% ist der Variationskoeffizient: Standardabweichung / Mittelwert x 100 in %.

	Intra-Assay-Präz. high Level [pg/ml]	Inter-Assay-Präz. high Level [pg/ml]	Intra-Assay-Präz. low Level [pg/ml]	Inter-Assay-Präz. low Level [pg/ml]
Mw	53,52	56,01	5,02	9,09
Stabw	1,52	2,30	0,39	0,88
Vk%	2,8%	3,60%	7,7%	9,70%

Die Präzision sollte bei ELISA's kleiner als 10% sein (38, 68). Dieses Kriterium ist für beide Konzentrationsbereiche erfüllt. Auffallend ist, dass die Präzision im höheren Konzentrationsbereich deutlich niedrigere Prozentwerte ergibt als im niedrigen.

Sensitivität

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze eines ELISA gibt an, welches die Mindestkonzentration eines Analyts ist, welche gerade noch detektiert werden kann und wird auf der Grundlage der Kalibrationskurve bestimmt. Sie ist definiert als die Konzentration, deren Extinktion drei Standardabweichungen über der des Nullstandards liegt und somit einen signifikanten Unterschied zum Nullkalibrator ergibt (34). Deshalb wurde zur Beurteilung des Erfolges einer Optimierungsmaßnahme neben der Standardkurve auch jeweils die Sensitivität des Messsystems bestimmt. Dazu wurden mindestens 16 Wiederholungsmessungen des Nullstandards durchgeführt und anschließend die Standardabweichung für diese Messreihe berechnet.

Es wurde der Einfluss der Probeninkubationszeit und des Probendiluents auf die Sensitivität untersucht. Dazu inkubierten die Proben auf einer Platte 2 Stunden und auf der anderen Platte 20 Stunden. In einem dritten Ansatz wurde die Menge des Probendiluents von 50 µl auf 100 µl pro Well bei gleich bleibendem Probenvolumen (100 µl) erhöht. Ansonsten wurden die

Proben gemäß der oben beschriebenen Arbeitsanleitung behandelt. Zusammenfassend stellt sich die Optimierung der Sensitivität wie folgt dar:

Nach nur 2 Stunden Probeninkubation ergab sich eine Sensitivität von **3,1 pg/ ml** , die für unsere Fragestellungen nicht ausreichend ist, weil sie weit oberhalb der Ruhewerte von gesunden Sportlern liegt ($< 1,0$ pg/ml). Derselbe Versuchsansatz mit einer Probeninkubationszeit von 20 Stunden, ergab eine Sensitivität von **0,68 pg/ ml** . Optimierung des Verhältnisses von Probe zu Probenverdünnungsmedium (von 2 : 1 auf 1 : 1) und gleichzeitige Erhöhung des Gesamtvolumens von Probe und Diluent von 150 μ l auf 200 μ l verbesserte die Sensitivität noch einmal deutlich auf einen Wert von **0,49 pg IL-6/ ml**.

Tabelle 22 zeigt die Optimierungsmaßnahmen zur Verbesserung der Sensitivität noch einmal im Überblick.

Tabelle 22: Optimierungsmaßnahmen am IL-6-ELISA und der daraus resultierenden Sensitivität

Optimierungsmaßnahme	Sensitivität
2 Stunden Probeninkubation	3,1 pg/ml
20 Stunden Probeninkubation	0,68 pg/ml
Optimierung des Verhältnisses von Probe zu Probenverdünnungsmedium/ Erhöhung des Gesamtvolumens von Probe und Diluent	0,49 pg/ml

Zusammenfassend kann das hier beschriebene IL-6 ELISA-System mit einer Sensitivität von **0,49 pg/ml** charakterisiert werden.

Wiederfindung

Für die Validierung eines ELISA-Messsystem ist die Wiederfindung eines der wichtigsten Qualitätskriterien. Dazu werden Proben im logarithmischen Verhältnis verdünnt. Es wurde kommerziell hergestelltes rekombinantes IL-6-Kontrollmaterial (Beckman-Coulter, Krefeld) 10 fach verdünnt, damit es in dem für sportmedizinische Fragestellungen interessanten Messbereich liegt. Danach wurde dieses Kontrollmaterial noch einmal 1:2 verdünnt und an der Eichkurve ausgewertet, um die Wiederfindung sicherstellen zu können. Für die beiden Konzentrationen wurde eine 4-fach Bestimmung durchgeführt. Die jeweiligen Mittelwerte wurden miteinander verglichen. Es wurden Standardabweichung, Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmt. Die Wiederfindung wird ausgedrückt durch den Quotienten aus dem gemessenen Wert und erwarteten Wert, multipliziert mit dem Faktor 100 und angegeben in Prozent [%]. Tabelle 23 zeigt das Messergebnis.

Tabelle 23: Wiederfindung und Verdünnung einer IL-6-Probe

Proben-Konz.	Anzahl der Messungen	Mittelwert [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	vk%	erwartete Konz.	Wiederfindung [%]
Unverdünnt	4	20,71	0,24	1,2%	k.A.	
1:2	4	10,08	0,42	4,2%	10,36	103%

Zusammenfassend lässt sich die Wiederfindung für das Messsystem im angegebenen Messbereich und mit der Anzahl der beschriebenen Probenverdünnungen mit **103%** charakterisieren.

3.1.1.2 Entwicklung und Optimierung des CRP-ELISA

Antikörpertitration

Die Antikörpertitration des ultrasensitiven CRP-ELISA erfolgte analog der Titration des IL-6-ELISA. Die Coating-Antikörper-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] waren 0,5 – 0,75 – 1,0 – 1,25, die Detektor-Antikörperkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] 0,125 – 0,25 – 0,5 und die Standardkonzentrationen [mg/l] 0 – 1 – 5 – 25. Die Antikörper und Standards wurden nach dem Pipettierschema für den IL-6-ELISA durchgeführt (siehe Abbildung 5). Die Arbeitsschritte lassen sich wie folgt zusammenfassen (die genaue CRP-ELISA-Arbeitsanleitung befindet sich im Anhang):

- Coating über Nacht im Kühlschrank.
- Waschschrift (1x)
- Blocken der Platten
- Waschschrift (3x)
- Pipettieren der Standards gemäß dem Schema.
- Inkubation 4 Stunden im Kühlschrank
- Waschschrift (5x)
- Pipettieren des Detektor-POD-Antikörpers
- Inkubation für 2 Stunden im Kühlschrank
- Waschschrift (7x)
- Substratinkubation
- Pipettieren der Stopplösung
- Messung am Plattenreader

Da der Detektor bereits mit der Meerettich-Peroxidase konjugiert war, entfiel im Vergleich zum IL-6-ELISA ein Arbeitsschritt, nämlich die Biotin-vermittelte Bindung von HPR-POD

an den Detektorantikörper. Dies ermöglichte es, den CRP-ELISA an einem einzigen Arbeitstag komplett durchzuführen.

Es zeigt sich deutlich, dass bei einer Coating-Antikörper-Konzentration von $1,0 \mu\text{g} / \text{ml}$ die Kurven die höchsten Steigungen haben. Der obere Grenzwert für die Detektor-Antikörper-Konzentration, ab der keine Steigerung mehr erkennbar ist, liegt bei $0,25 \mu\text{g} / \text{ml}$ (siehe Abbildung 8).

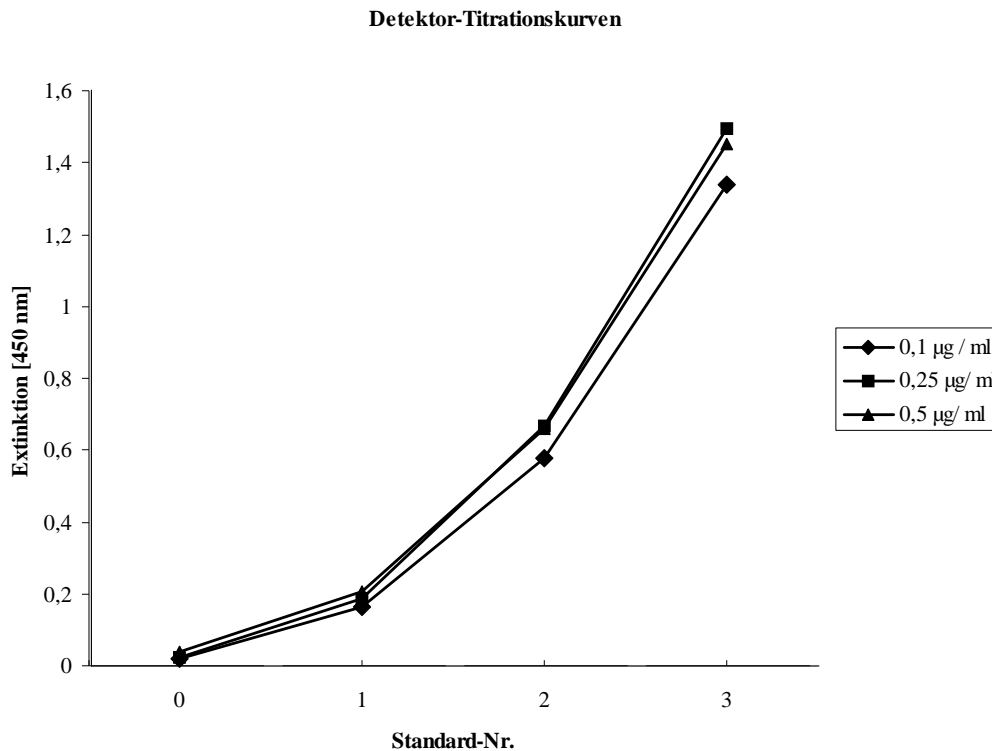


Abbildung 8: Detektor-Titrationskurven für den CRP-ELISA bei einer Coating-Antikörper-Konzentration von $1,0 \mu\text{g} / \text{ml}$. Eine Konzentrationserhöhung von $0,25 \mu\text{g}$ Detektorantikörper auf $0,5 \mu\text{g}$ ergibt keine Verbesserung der Standardkurve.

Optimierungsmaßnahmen weiterer Testkomponenten

Die Optimierungsmaßnahmen, die bei der Entwicklung des IL-6-ELISA zur Anwendung kamen, zeigten sich auch für den CRP-ELISA gewinnbringend. Vor allem die Inkubationsdauer musste optimiert werden. Die Übernahme der BSA-, der Tween-20- und der Harnstoff-Konzentrationen für die verschiedenen Diluents aus dem IL-6-ELISA-Protokoll reduzierten die unspezifische Bindung beim CRP-ELISA auf ein Minimum. Abbildung 9 zeigt beispielhaft den Einfluss von Harnstoff auf die Eichgerade. Auf die Darstellung weiterer Optimierungsmaßnahmen wird aus Platzgründen verzichtet.

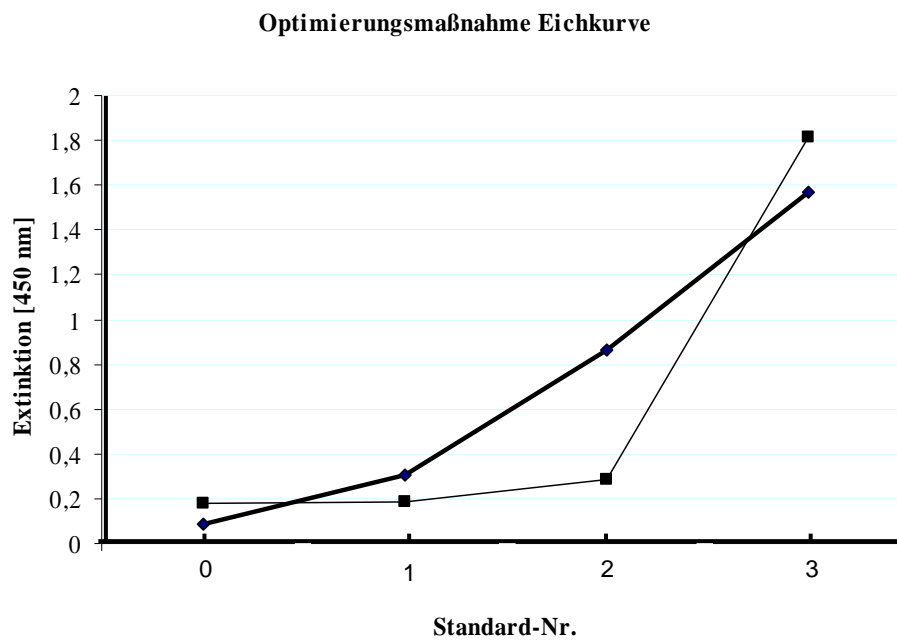


Abbildung 9: Der Einfluss von 0,6 M Harnstoff im Diluent (dicke Linie) auf die Eichkurve im Vergleich zum Diluent ohne Harnstoff (dünne Linie). Deutlich erkennbar ist die bessere Auflösung im niedrigen Konzentrationsbereich durch den Einfluss von Harnstoff, der geringere unspezifische Bindung (niedriger Nullstandard und höhere Steigungen zwischen den einzelnen Standardkonzentrationen) ermöglicht.

Charakterisierung des Testsystems

Präzisionsmessungen

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision des CRP-ELISA wurden 3 Proben in unterschiedlichen Konzentrationen auf der gleichen Platte 24 mal gemessen. Zur Berechnung der Inter-Assay-Präzision (Tag-zu-Tag Abweichung) wurden 3 Probe in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen auf unterschiedlichen Platten gemessen. Die Konzentrationsbereiche wurden nach ihrer Lage auf der Eichgeraden festgelegt (siehe Abb. 10). Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Intra- und Interassay-Präzisionsmessungen des hs-CRP-ELISA im hohen (high Level), mittleren (middle Level) und niedrigen Konzentrationsbereich (low Level)

	Intra-P. high Level [pg/ml]	Inter-P. high Level [pg/ml]	Intra-P. middle Level [pg/ml]	Intra-P. middle Level [pg/ml]	Intra-P. low Level [pg/ml]	Inter-P. low Level [pg/ml]
Mw	4,04	4,01	0,81	0,74	0,40	0,35
Stabw	0,20	0,21	0,05	0,05	0,02	0,04
Vk%	5,0%	5,2%	6,2%	6,8%	5,0%	11,4%

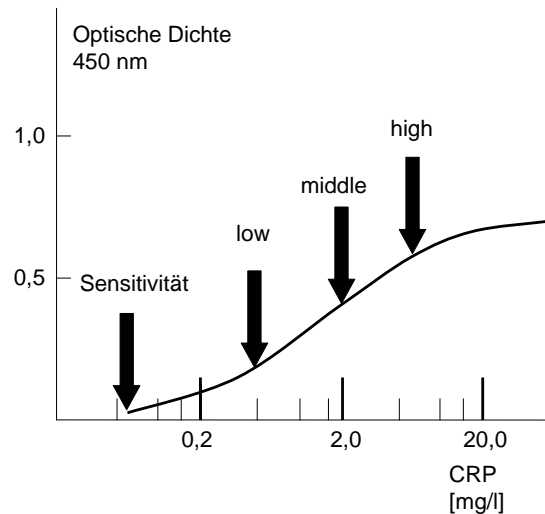


Abbildung 10: Konzentrationsbereiche der Präzisionskontrollen (modifiziert nach Kemeny, D.M (37))

Sensitivität

Dazu wurden 20 Wiederholungsmessungen des Nullstandards durchgeführt und anschließend die Standardabweichung für diese Messreihe berechnet. Die dreifache Standardabweichung des Nullstandards, als Sensitivität des Messsystems definiert, ergab an der Standardkurve einen Wert von 0,03 mg/l.

Wiederfindung

Dazu wurde in einem ersten Versuchsansatz kommerziell hergestelltes Probenmaterial (Orthoclinical-Diagnostics, Neckargemünd) laut Arbeitsanleitung zunächst 2000 x verdünnt. Der Sollwert der Probe betrug 20 mg CRP/ l. Dann wurde die Probe im logarithmischen Verhältnis 1:2 und 1:4 verdünnt. Die Messwerte wurden an der Eichkurve ausgewertet, um die Wiederfindung sicherstellen zu können. Für die beiden Konzentrationen wurde eine 8-fach Bestimmung durchgeführt. Die jeweiligen Mittelwerte wurden miteinander verglichen. Es wurde Standardabweichung, Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmt. Die Wiederfindung wird ausgedrückt durch den Quotienten aus gemessenen Wert und erwartetem Wert, multipliziert mit dem Faktor 100 und angegeben in Prozent [%]. Tabelle 25 zeigt das Ergebnis der Messungen.

Tabelle 25: Wiederfindung und Verdünnung einer CRP-Probe

Proben-Konz.	Anzahl der Messungen	Mittelwert [pg/ml]	Stabw. [mg/ml]	VK%	Erwartete Konz.	Wiederfindung [%]
Unverdünnt	8	17,50	3,56	20,3%	k.A.	
1 : 2	8	8,75	1,26	14,4%	8,75	100%
1 : 4	8	4,32	0,51	11,8%	4,38	98,6%

In einem zweiten Versuchsansatz wurden im Rahmen eines Ringversuches (siehe Kapitel 3.1.2.3.4) 2 Proben (Nr. 61 und Nr. 62) 1 : 1, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 30 und 1 : 50 verdünnt. Parallel dazu wurden die Proben auf dem klinisch-chemischen Automaten gemessen. Die Wiederfindung wird erneut ausgedrückt durch den Quotienten aus gemessenen Wert und erwartetem Wert, multipliziert mit dem Faktor 100 und angegeben in Prozent [%].

Das Ergebnis zeigt Tabelle 26. Aufgrund der geringen Sensitivität des Vitros 250, konnten die Verdünnungstufen an diesem Automaten nicht gemessen werden.

Tabelle 26: Verdünnungsstufen und Wiederfindung von 2 CRP-Proben des INSTAND Ringversuches

Probe	CRP [mg/l] hs-ELISA (Mittelwerte)	CRP [mg/l] Vitros 250 (Mittelwerte)	Erwartete Konz.	Wiederfindung [%]
61 / 1 : 1	1,72	0,93	k.A.	k.A.
61 / 1 : 10	0,15	-	0,17	88,2
61 / 1 : 20	0,08	-	0,08	100
61 / 1 : 50	0,03	-	0,03	100
62 / 1 : 1	>25	33,83	k.A.	k.A.
62 / 1 : 10	3,48	-	k.A.	k.A.
62 / 1 : 20	1,88	-	1,74	108,1
62 / 1 : 50	0,96	-	0,70	137,1

Externe Qualitätskontrolle

Charakteristisch für die externe Qualitätskontrolle im Labor ist, dass sie nicht durch Mitarbeiter des zu prüfenden Labors, sondern durch ein außen stehendes Referenzlaboratorium – also *extern* – durchgeführt wird. Die hier beschriebene Prüfung wurde von INSTAND e. V., einer Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. (vormals Hämometerprüfstelle) durchgeführt. INSTAND e. V. bietet etwa 200 Ringversuche aus den einzelnen Bereichen der Laboratoriumsdiagnostik an. Nach den geltenden Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen sind für bestimmte Analyte Pflichtringversuche

und eine 4-malige Teilnahme pro Jahr vorgeschrieben. Des Weiteren gibt es auf freiwilliger Basis Ringversuche mit rein wissenschaftlichem Charakter. Da CRP nicht im Panel unserer Routineparameter eingeordnet ist, war die Teilnahme an diesem Ringversuch vordergründig von wissenschaftlichem Interesse.

Der CRP-Ringversuch hatte die Nr. 322 und fand im Oktober 2008 statt. Dazu wurden von INSTAND e.V. 2 Probenröhrchen mit der Nummer 61 und 62 an unsere Einrichtung versendet. Insgesamt nahmen an diesem Ringversuch 159 Teilnehmer am qualitativen und 413 am quantitativen Test teil. Nach Erhalt wurden die Proben mit unserem hs-CRP-ELISA nativ und in verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle 27 dargestellt. Für die Auswertung wurde von INSTAND e.V. ein Ringversuchs-Protokollbogen den Proben beigelegt. Auf diesem Beiblatt sind Reagenzien- und Geräteschlüssel, sowie eine Legende zum Eintrag der verwendeten Methode und qualitative Bewertungsrichtlinien aufgeführt. Der Ringversuchsprotokollbogen ist im Anhang aufgelistet.

Tabelle 27: Eingesendete Ergebnisse des CRP-Ringversuches vom 5.11.2008

	Methode	Gerät	Probe 61	Probe 62
CRP qualitativ	ELISA	Dynatech MR 4000	negativ	positiv
CRP quantitativ	ELISA	Dynatech MR 4000	1,72 mg/l	34,8 mg/l

Der cut-off-Bereich für die qualitative Bewertung war 5 mg/l, wobei ein Kürzel für negativ ($\text{CRP} < 5 \text{ mg/l}$), für positiv ($\text{CRP} > 5 \text{ mg/l}$) und für grenzwertig ($\text{CRP} = 5 \text{ mg/l}$) in den Protokollbogen eingetragen werden sollte.

Die Bestehensquote der 159 Teilnehmer bei der qualitativen Analyse lag bei 95,0 %. Die Probe 61 stuften korrekterweise 96,2% als negativ und die Probe 62 richtigerweise 98,1 % der Teilnehmer als positiv ein. Unsere qualitativen Bewertungen erwiesen sich somit als richtig.

Die quantitative Ergebnisauswertung der 413 teilnehmenden Laboratorien führte zu einer Gesamtbestehensquote von 87,2 %. Für das ELISA-Kollektiv mit 12 Teilnehmern wurde eine Quote von 83,3% festgestellt. Die qualitativen und quantitativen Zielwerte mit Bewertungsbereichen sowie die Ergebnisse des ELISA-Teilnehmerkollektivs sind in Tabelle 28 dargestellt. Die Originalergebnisausdrucke sowie die INSTAND-Gesamtübersicht sind im Anhang gelistet.

Tabelle 28: CRP-Ringversuch: Qualitative / quantitative Zielwerte mit Bewertungsbereichen, Bestehensquoten und Ergebnisse des ELISA-Teilnehmerkollektivs

Probe	Qual. Zielwert	Bestehens-Quote qual. [%]	Quant. Zielwert [mg/l]	Bewertungsbereich [mg/l]	Teiln.-Mittelw. [mg/l]	Eig. Wert [mg/l]	Teiln.-VK%	Bestehens-quoten quant. [%]
61	negativ	96,2	k.A.	0 - 4,99	1,43	1,72	25,3	91,7
62	positiv	98,1	29,0	21,1 – 36,9	32,0	34,8	13,2	83,3

Wie in Tabelle 28 zu sehen ist, liegen unsere quantitativen Messergebnisse für beide Proben im Bewertungsbereich, und somit hatten wir den Ringversuch bestanden. Das entsprechende Zertifikat ist ebenfalls dem Anhang beigelegt.

3.1.2 Studienabschnitt A: Belastungsstudie mit Referenzbestimmungsmethoden für CRP und IL-6

Das Studiendesign, Probandenkollektiv und die Methoden sind in Kapitel 2 ausführlich beschrieben worden. Es sollten belastungsinduzierte Anstiege von Serum-IL-6 und Serum-CRP Ruhewerte im Methodenvergleich für die Gesamtgruppe untersucht werden. Insgesamt nahmen 45 Probanden an dieser Studie teil. Es wurden eine Ruheblutentnahme und eine Entnahme direkt nach der Belastung durchgeführt. Die stufenförmig ansteigende Fahrradspiroergometrie erstreckte sich bis zur subjektiven Erschöpfung.

CRP-Referenzmessungen

Das CRP wurde mit einem laboreigenen ultrasensitiven Sandwich-ELISA bestimmt. Aliquots der gleichen Proben wurden in einem externen kommerziellen Referenzlabor im Vergleich dazu mittels kinetischer Immunnephelometrie am Automaten gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 29 dargestellt. Insgesamt waren es 47 Teilnehmer. Da bei 3 Probanden der gemessene CRP-Wert geringer als die Sensitivität des Automaten (CRP < 0,2 mg/l) war, mussten die Ergebnisse von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen werden.

Tabelle 29: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) der CRP-Messungen im Methodenvergleich

Anzahl der Probanden	Sandwich-ELISA [mg/l] MW± Stabw	Kinetische Immunnephelometrie [mg/l] MW± Stabw
n = 44	4,50 ± 4,54	2,81 ± 4,54

Zwischen dem CRP-Sandwich-ELISA und der Kinetischen Nephelometrie ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied. Die detaillierten Messergebnisse sind im Anhang gelistet.

IL-6-Referenzmessungen

Für den Methodenvergleich der IL-6 Bestimmungen wurden die Nachbelastungswerte der Studie mit einbezogen. Weil Messergebnisse, die außerhalb des Messbereiches des IL-6-ELISA's lagen, mussten von den 47 Probanden 3 Teilnehmer ausgeschlossen werden. 1 Person wurde zusätzlich ausgeschlossen, weil kein Nachbelastungswert vorlag, so dass insgesamt 43 Probanden ausgewertet werden konnten. Tabelle 30 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der IL-6-Messungen für beide Blutentnahmezeitpunkte.

Tabelle 30: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stabw) der IL-6-Sandwich-ELISA-Messungen im Methodenvergleich (n = 43)

Blutentnahme-Zeitpunkt	Photometrisch [mg/l] MW± Stabw	Chemilumineszenz [mg/l] MW± Stabw.
Ruhewert	25,05 ± 63,05	1,28 ± 1,43
Nachbelastungswert	30,44 ± 76,06	2,16 ± 2,24

Die ANOVA mit Messwiederholung zeigte einen signifikanten Haupteffekt für den Methodenvergleich ($F = 6,00$, $p > 0,05$) und für den Zeitpunkt der Messung ($F = 8,82$, $p < 0,05$). Desweiteren zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen den Variablen Methodenvergleich und den Messzeitpunkt ($F = 4,59$, $p < 0,05$). Im folgenden Post-hoc-Test nach Tukey HSD ergab sich eine hohe Signifikanz zwischen den beiden Messzeitpunkten der ELISA-Messung. Dem gegenüber zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Messzeitpunkte der Chemilumineszenz ($p = 0,92$). Zwischen den Methoden zeigte sich für beide Messzeitpunkte (Ruhewert: $p > 0,01$, Nachbelastungswert: $p > 0,01$) ein hoch signifikanter Unterschied. Die detaillierten Messergebnisse sind im Anhang gelistet.

3.2 Studienabschnitt B: Vergleich kapilläre und intravenöse Blutentnahme

IL-6-Vergleich

In die statistische Analyse wurden nur 83 der 205 Wertepaare einbezogen. Die Referenzwerte beziehen sich auf die Angaben eines Standardwerkes für Klinische Chemie (Thomas, L (2005). *Labor und Diagnose*. Th-Books 6, 788.) und liegen für Interleukin-6 zwischen 0 und 10 pg/ml.

Beide Messreihen für Interleukin-6 waren nicht normalverteilt und der nichtparametrische Wilcoxon Test für gepaarte Stichproben ergab keine signifikanten Unterschiede ($p=0,98$). Der Interclass-Coeffizient (ICC) ergab eine hohe Korrelation beider Messreihen ($ICC = 0,789$).

Die Bland Altman Analyse ergab eine mittlere Differenz von 0,151 pg/ml mit einem 95% KI von -0,222 pg/ml bis 0,324 pg/ml. Die obere und untere Übereinstimmungsgrenze war 3,303 pg/ml (KI: 2,708 pg/ml bis 3,898 pg/ml) und -3,001 pg/ml (KI: -3,596 pg/ml bis -2,406 pg/ml). 92,8% aller Messwerte befanden sich innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen ($MW \pm 2$ Stabw). Innerhalb der dazugehörigen KI liegen insgesamt 95,18 %.

CRP-Vergleich

183 Wertepaare konnten analysiert werden. Auch für die CRP-Messreihen konnte keine Normalverteilung festgestellt werden. Allerdings ergab der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben hochsignifikante Unterschiede ($p<0,001$).

Im physiologischen Referenzbereich liegen 92,02 % der Messwerte. Der Referenzbereich bezieht sich wie für IL-6 auf die Angaben im Standardwerk von Lothar Thomas (Thomas, L (2005). *Labor und Diagnose*. Th-Books 6, 717.) und liegen zwischen 0,068 und 8,2 mg/l.

3.3 Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetik

CRP-Vollblut-Bestimmung

Belastungsinduzierte Plasma-CRP-Kinetik

In Abhängigkeit von den Messzeitpunkten ändern sich die CRP-Konzentrationen. Die höchste Auslenkung zeigte CRP 24 h nach der Belastung. Tabelle 31 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen sowie die minimalen und maximalen IL-6 Konzentration für jeden Zeitpunkt der Laufbandergometrie ($n = 20$).

Tabelle 31: Belastungsinduzierte Plasma-CRP-Kinetik: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (Stabw), Minimum (Min] und Maximum (Max) der CRP-Plasmakonzentrationen in mg/l induziert durch eine 90 minütige extensiven (80% IAS) Laufbandergometrie ($n = 20$).

Probanden-Nr.	Vor [mg CRP/l]	Post [mg CRP/l]	1hp [mg CRP/l]	2hp [mg CRP/l]	6hp [mg CRP/l]	24hp [mg CRP/l]
MW	0,53	0,63	0,6	0,62	0,92	2,26
ST	0,66	0,91	0,83	0,87	1,17	3,61
Min	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06
Max	2,44	3,83	3,4	3,58	5,35	17,33

In Abbildung 11 sind die belastungsinduzierten CRP-Wert-Veränderungen dargestellt. Die detaillierten Messergebnisse sind im Anhang in Tabelle 42 aufgeführt.

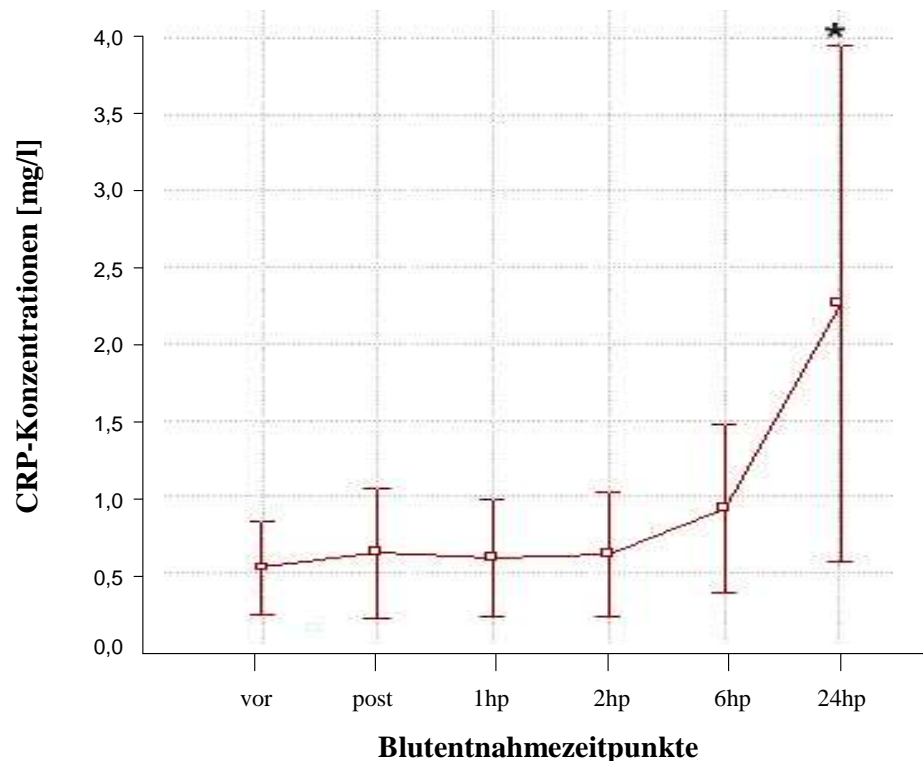


Abb. 11: Belastungsinduzierte Veränderungen der CRP-Konzentrationen im Plasma (MW± Stabw) vor, während und nach einer extensiven Laufbandbelastung (80% IAS, 90 Minuten)

Belastungsinduzierte Veränderungen der Plasma-IL-6-Konzentration im Zeitverlauf

Insgesamt nahmen 15 Probanden an der Studie teil. Bei 3 Probanden konnte zu jeweils einem Blutentnahmezeitpunkt keine Probe aus technischen Gründen entnommen werden. Deshalb wurde für diese fehlenden IL-6-Werte eine Mittelwertangleichung durchgeführt. Tabelle 32 zeigt die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen im Zeitverlauf. Die vollständigen Messreihen sind im Anhang gelistet.

Tabelle 32: Belastungsinduzierter IL-6-Anstieg bei einer stufenförmig ansteigender Fahrrad-legend-Ergometrie (n = 15). Dargestellt sind die IL-6-Mittelwerte und die Standardabweichung in pg/ml.

	vor Belastung	Ende 50 Watt-Stufe	1 Minute nach Belastungsabbruch	45 Minuten nach Belastungsabbruch
Mittelwert	0,74	1,17	4,69	31,62
Standardabw.	0,46	1,02	2,00	25,87
Min	0,23	0,33	2,40	5,06
Max	1,84	3,68	8,49	78,63

Alle Messreihen waren normalverteilt (Kolmogorow-Smirnow-Test $p > 0,5$). Der t-Test für gepaarte Stichproben zeigte hoch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$). Für die weitere Überprüfung auf Signifikanz wurde auf Verletzung der Sphärizität und Greenhouse-Geisser-Korrektur getestet und der post hoc Test nach Tukey HSD durchgeführt. Die belastungsinduzierten Anstiege der IL-6-Plasmakonzentrationen und die entsprechenden Signifikanzen sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

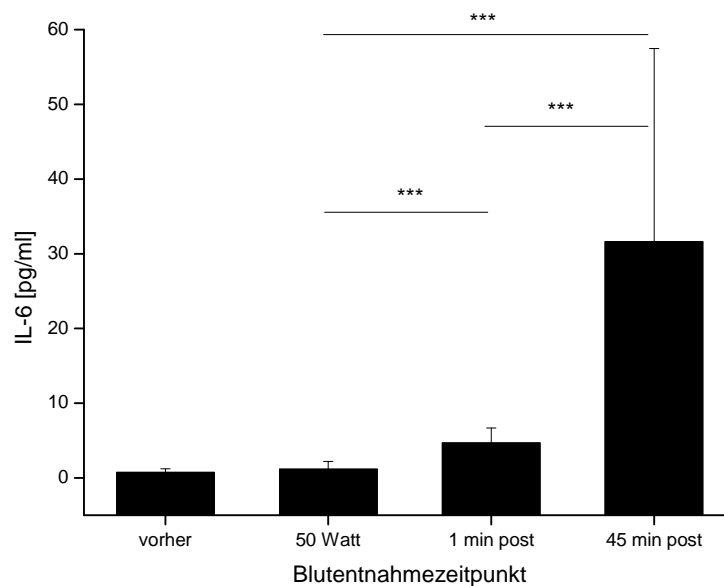


Abb. 12: Belastungsinduzierte Veränderungen der IL-6-Konzentrationen (MW ± Stabw) vor, während und nach einem fahrradergometrischen Stufentest. (***) $p \leq 0,001$, t-Test für gepaarte Stichproben).

Zusätzlich wurde noch einmal wie im Studienabschnitt B in der Vorbelastungsphase die kapilläre Blutentnahmetechnik mit der intravenösen Blutentnahmetechnik hinsichtlich der dabei resultierenden IL-6-Werte verglichen. Auch hier musste für einen fehlenden IL-6-Wert eine Mittelwertangleichung erfolgen. Tabelle 33 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima der daraus resultierenden IL-6-Werte für die beiden Blutentnahmetechniken. Die detaillierten Messergebnisse sind im Anhang gelistet.

Tabelle 33: Mittelwerte und Standardabweichungen für IL-6 Ruhewerte in pg/ml für die intravenöse und kapilläre Blutentnahmetechnik (n = 15).

	Ruhewert intravenös [pg/ml]	Ruhewert kapillär [pg/ml]
Mittelwert	0,49	0,74
Standardabweichung	0,28	0,46
Min	0,10	0,23
Max	1,11	1,84

Beide Messreihen waren normalverteilt (K-S-Test, $p > 0,2$). Der t-Test für gepaarte Stichproben ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Messreihen ($p < 0,05$).

CRP-Vollblutbestimmung

Für 12 Probanden konnten CRP-Werte mit jeweils 3 unterschiedlichen Blutentnahmetechniken verglichen werden. Tabelle 34 zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima.

Tabelle 34: Vergleich der CRP-Vollblutmethode mit der intravenösen und kapillären Blutentnahmetechnik für die CRP-Plasma-Bestimmung (n = 12).

	CRP [mg/l]		
	Intravenöse Blutentnahme	Kapilläre Blutentnahme	Vollblut [mg CRP/l]
Standardabweichung	0,86	1,19	0,45
Mittelwert	0,71	0,8	0,37
Minimum	0,07	0,11	0,03
Maximum	3,14	4,37	1,58

Die statistische Analyse (ANOVA, post-hoc-Test nach Duncan) zeigte signifikante Unterschiede zwischen allen 3 Messreihen ($p < 0,05$).

4 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie sollten geeignete Instrumente zur Konzentrationsbestimmung von C-reaktivem Protein und Interleukin-6 evaluiert werden. Die Anwendung erfolgte dann im letzten Studienabschnitt, indem die belastungsinduzierten Kinetiken der beiden Parameter untersucht und anhand vergleichbarer Studien analysiert und interpretiert wurden. Ergänzend sollte eine Probenentnahmetechnik überprüft werden, die Feldtest-tauglich ist, d.h. minimal-invasive kapilläre Blutentnahmen ermöglicht.

Studienabschnitt A

Das Ziel von Messungen ist es, möglichst korrekte Ergebnisse zu erhalten. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass Messungen immer mit Fehlern behaftet sind. Die Validität (Gültigkeit) ist neben der Reliabilität und Objektivität ein klassisches Gütekriterium zur Überprüfung quantitativer Forschungsergebnisse. Deshalb war es die erste Aufgabe dieses Projektes herauszufinden, ob die beiden ELISA nach ihrer Entwicklung und Optimierung CRP bzw. IL-6 zuverlässig messen können.

Entwicklung und Optimierung der ELISA's

Die Antikörper-Titration und die Optimierungsmaßnahmen weiterer Testkomponenten, die die unspezifische Bindung reduzieren sollten, lieferten Standardkurven, die die in der Literatur beschriebenen Kriterien erfüllten (38, 15, 68, 37). Zur Überprüfung der Reliabilität (Zuverlässigkeit und Messgenauigkeit) wurden Intra- und Interassay-Präzisionsmessungen sowie Probenmaterial in Verdünnungsreihen gemessen und auf Wiederfindung überprüft. Die Charakterisierung der Assay's wurde mit der Bestimmung der Nachweisbarkeitsgrenze (Sensitivität) vervollständigt. Im Vergleich mit wissenschaftlichen Publikationen, die Validierung von ELISA's thematisch darstellen (105, 49, 30, 37) erwiesen sich unsere ELISA's hinsichtlich der genannten Gütekriterien zur Überprüfung der Reliabilität als ebenbürtig. Dabei waren die vk% der Präzisionsmessungen $> 10\%$, die Sensitivität für CRP und IL-6 in der gleichen Größenordnung ($\text{CRP} < 0,5 \text{ mg/l}$; $\text{IL-6} \leq 1 \text{ pg/ml}$) wie in der Literatur beschrieben und die Wiederfindung bei $100 \pm 5\%$.

Die externe Qualitätskontrolle für CRP wurde von INSTAND e.V., einer Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. im Rahmen eines Ringversuchs durchgeführt. Die qualitativen und quantitativen Werte unserer CRP-Messungen lagen in den vorgeschriebenen Bewertungsbereichen.

Studienabschnitt A: Prä-Validierung vom CRP- und IL-6-ELISA

Nachdem alle Gütekriterien erfüllt worden waren, erfolgte in einem „Prä-Validierungsschritt“ die Anwendung der ELISA an Proben, die im Rahmen einer Belastungsstudie intravenös entnommen wurden. Die Ergebnisse der Analysen wurden mit klinisch validierten Analysesystemen verglichen.

CRP-ELISA

Die statistische Analyse zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der Messreihe, die der CRP-ELISA ergab, im Vergleich zu der Messreihe, die mit der klinischen Referenzmethode (Kinetische Immunnephelometrie) ermittelt wurde. Der ELISA lieferte höhere Werte. Methodenbedingte Unterschiede bei der CRP-Bestimmung sind schon seit langem bekannt (24). Aufgrund dieser Abweichung werden bei Ringversuchen auch unterschiedliche Zielwerte in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode vorgegeben. Hauptursache dafür könnte im vorliegenden Falle unterschiedliches Standardmaterial für ELISA bzw. Referenzmethode sein. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, hätte man gleiches Standardmaterial benutzen müssen. Aus organisatorischen Gründen war dies allerdings nicht möglich. Weitere Ursachen für Abweichungen könnten bestimmte Plasmaeigenschaften sein, die das Streulichtverhalten von Proben verändern (lipämisches, hämolytisches oder ikterisches Plasma) und damit vor allem die Ergebnisse der Referenzmethode bei der CRP-Analyse beeinflussen. Da der CRP-ELISA 2000 fach verdünnte Proben erfordert, spielen die genannten Plasmaeigenschaften für die Messung keine Rolle.

Bei der Erstellung von Normwerten und Tabellen für die Risikostratifizierung für cardiale Erkrankungen von Personengruppen sollten derartige Methoden bedingte Unterschiede auf jeden Fall berücksichtigt werden. Wichtig ist die Zertifizierung des Standardmaterials nach den Regularien der WHO. Am 22 September 2005 hat die US Food and Drug Administration (FDA) neue Richtlinien für die Industrie im Hinblick auf die hoch sensitive CRP-Analyse unter dem Titel *Review Criteria for Assessment of C-Reactive Protein (CRP), High Sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP) and Cardiac C-Reactive Protein (cCRP) Assays* veröffentlicht (16, 72). In der vorliegenden Studie war das CRP-Standardmaterial nicht WHO-zertifiziert. Die CRP-Konzentration des Rohstandards wurde aber mit zertifizierten Standards am Automaten (Vitros 250, Orthoclinical diagnostics Raritan, New Jersey, USA) in Mehrfachmessungen ermittelt.

Unspezifische Bindungen des CRP im ELISA, konnten durch den Vergleich mit den Referenzmessungen nicht festgestellt werden.

IL-6-ELISA

Bei der IL-6-Prävalidierung wurden im Gegensatz zur CRP-Prävalidierung für jede Methode 2 Messreihen ermittelt. Es wurde bei jedem Probanden vor und nach der Belastung Blut für die IL-6-Messung intravenös entnommen. Die Referenzmethode lieferte hierbei deutlich niedrigere Mittelwerte als der laboreigene ELISA (siehe Tabelle 29). Einen belastungsinduzierten signifikanten Anstieg des IL-6 konnte nur für den laboreigenen ELISA ermittelt werden. Bei der Referenzmethode ließen sich keine pathologisch-erhöhte IL-6-Werte feststellen, während für unseren laboreigenen ELISA 10 Probanden (für $n = 46$) ohne sonstige klinische Befunde pathologisch erhöhte IL-6-Werte hatten ($\text{IL-6} > 10 \text{ pg/ml}$). Ursache für diese vermutlich falsch-positive Messergebnisse waren wahrscheinlich unspezifische Bindungen verursacht durch Plasmabestandteile, die eventuell chemisch ähnliche Epitope hatten wie IL-6 und deshalb von dem laboreigenen ELISA detektiert wurden. Da die Referenzmethode einfacher, schneller und präziser war, wurde im Studienabschnitt C für die IL-6-Analysen dieser photometrische IL-6-ELISA nicht mehr verwendet, sondern die klinisch validierte Referenzmethode.

Der belastungsinduzierte signifikante Anstieg des IL-6, gemessen durch den photometrischen ELISA ist vermutlich ein Artefakt. Vergleiche mit in renommierten Fachzeitschriften publizierten Belastungsstudien, bei denen die IL-6-Sekretion ins Plasma in Abhängigkeit von der Belastungsintensität und -dauer thematisiert hatten, bestärken den Verdacht eines methodisch bedingten IL-6-Anstiegs (18, 17, 69). Der fahrradsitzend durchgeführte Stufentest dürfte zu kurz gewesen sein, um einen belastungsinduzierten IL-6-Anstieg zu provozieren. Im Studienabschnitt C konnten wir bei einer ähnlichen Belastung direkt nach dem Test mit der alternativen IL-6-Bestimmungsmethode einen signifikanten Anstieg der IL-6-Plasmakonzentration feststellen (siehe Abbildung 13). Diesem Stufentest war aber eine 15-minütige niedrigstufige Belastung vorgeschaltet, so dass sich die Belastungszeit nahezu verdoppelte.

Studienabschnitt B: Kapilläre und intravenöse Blutentnahmetechnik zur IL-6- und CRP-Bestimmung

Interleukin-6

Wie in Kapitel 3.2 dargestellt, konnte kein signifikanter Unterschied der IL-6-Konzentration im Plasma festgestellt werden, wenn zeitgleich intravenös und kapillär Blut entnommen und die Proben miteinander verglichen wurden. Allerdings muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass nur 83 von den 205 an der Studie teilgenommenen Probanden in die statistischen Berechnungen eingeschlossen wurden, da - vermutlich methodisch bedingt - ein hoher Anteil der Proben außerhalb des physiologischen Referenzbereiches lagen. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, müsste die Studie mit der evaluierten Referenzmethode noch einmal durchgeführt werden.

C-reaktives Protein

Im Gegensatz zum IL-6 lagen beim CRP ca. 92% aller Probanden ($n = 183$) im Referenzbereich. Der ICC-Vergleich beider Blutentnahmetechniken zeigte signifikante Unterschiede. Eine ähnliche Studie, allerdings im nicht sensitiven CRP-Messbereich (Nachweisgrenze = 5 mg CRP/ml), wurde von Tegtmeyer 1990 in der Monatszeitschrift für Kinderheilkunde publiziert (88). Die kapillären und venösen Blutentnahmen wurde bei Säuglingen ($n = 101$) durchgeführt. Das mittlere Alter der Probanden war 5,8 Monate. Die CRP-Konzentration wurde turbidometrisch bestimmt. Im Ergebnisteil der Studie wurde beschrieben, dass es eine sehr hohe Korrelation ($r = 0,967$) zwischen beiden Messreihen gab. Mit der Vier-Felder-Tafel wurde für die Kapillarblutmethode eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität bzw. ein positiver Vorhersagewert von 98% mit einer Genauigkeit von 97% ermittelt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass durch die geringe Sensitivität des von Tegtmeyer beschriebenen CRP-Bestimmungsverfahrens nur 50 der 101 Probanden verwertbare CRP-Messungen ergaben. Bei der statistischen Interpretation muss bemängelt werden, dass die Berechnung der Korrelation nicht ausreichend ist, um auf Übereinstimmung schließen zu können. Unverständlich ist auch, dass trotz signifikanter Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen beiden Messreihen auf Übereinstimmung geschlussfolgert wird.

Studienabschnitt C: Belastungsinduzierte CRP- und IL-6-Kinetik. CRP-Vollblut-Bestimmung

Belastungsinduzierte Plasma-CRP-Kinetik

Es ist schon seit langem bekannt, dass körperliche Belastungen die APR induzieren (95). Verschiedene Studien konnten eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins, insbesondere nach längeren Ausdauerbelastungen nachweisen (77, 1). Vor allem längere Laufbelastungen und Trainingseinheiten mit überwiegend anaeroben Belastungsschema induzieren die CRP-Zunahme im Plasma der Probanden (11, 53). Das Maximum der CRP-Konzentration lag bei unserer Studie 24 Stunden nach der Laufbandbelastung und stimmt mit den Angaben in der Literatur überein (100, 46). Der Anstieg betrug das 4,5 fache des Ruhewertes. Im Vergleich zur Literatur ist das relativ viel. Nach einer moderaten (70% IAS) 4-stündigen Fahrradergometrie stellte Scharhag et al. (77) einen 3,6 fachen Anstieg bei nahezu mit unserer Studie übereinstimmenden CRP-Ruhewert fest. Der geringfügig höhere Anstieg des CRP der vorliegenden Studie könnte durch den höheren exzentrischen Anteil der Laufbandbelastung und die 10% höhere Intensität begründet sein, obwohl die Belastungsdauer nur 90 Minuten betrug. Dass länger andauernde Belastungen mit exzentrischer Komponente einen größeren inflammatorischen Reiz darstellen als kurz andauernde aerobe Belastungen, wurde schon von Weight et al. 1991 berichtet (102). Dort lag das CRP-Konzentrationsmaximum ebenfalls bei 24 Stunden nach dem Wettkampf, jedoch um ein Vielfaches höher, was der höheren Intensität und der Belastungsdauer des Marathons zu zuschreiben ist. Liesen et al. untersuchten 1991 (46) verschiedene Belastungsmodelle in Hinblick auf den belastungsinduzierten Anstieg der APR. So stieg die CRP-Konzentration mit einem Maximum bei 24 Stunden nach einem zweistündigen Lauf mit einer Intensität von 90% der 4 mmol Laktatschwelle um 400% an, bei einem dreistündigen Lauf mit 70% der 4 mmol Laktatschwelle um ca. 500% an, was die Bedeutung der Belastungsdauer unterstreicht.

IL-6-Vorbelastungswerte

Die signifikant unterschiedlichen Ruhewerte in Abhängigkeit von der Blutentnahme- Technik (intravenös versus kapillär), die im Studienabschnitt C ermittelt wurden, könnten durch den variierenden Blutentnahmezeitpunkt begründet sein. Die intravenösen Blutentnahmen wurden etwa 45 Minuten vor der kapillären Blutentnahme im Rahmen der Gesundheitsbeurteilungen durchgeführt, während die kapilläre Probengewinnungen unmittelbar vor den eigentlichen Belastungen stattfanden und als eigentliche Ruhewerte eingestuft wurden. Frühere Studien

weisen auf eine zirkadiane Rhythmik der IL-6-Sekretion mit einem Sekretionsgipfel spät in der Nacht hin (5, 82, 95). Die IL-6-Werte der später stattfindenden kapillären Ruheblutentnahmen waren im Mittel 0,25 pg/ml (51%) höher als die intravenöse, so dass der zirkadiane Rhythmus des IL-6 eine Rolle spielen könnte. Methodisch bedingte Differenzen können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, weil eine Vergleichsstudie - ähnlich wie im Studienabschnitt B beschrieben - für die neue IL-6-Bestimmungsmethode noch ansteht.

Belastungsinduzierte Veränderungen der Plasma-IL-6-Konzentration im Zeitverlauf

Northoff berichtete 1991 erstmals von einer signifikanten Zunahme der IL-6-Konzentration im Blut von 15 Läufern unmittelbar nach der Belastung. Das IL-6 war in den meisten Fällen 24 Stunden nach der Belastung wieder beim Ausgangswert (56). Diese belastungsinduzierte IL-6 Zunahme bei Läufern wird 1992 auch von Sprenger beschrieben. 22 gut trainierte Läufer bzw. Läuferinnen hatten nach einem 20 km-Lauf ein signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration mit einem Maximum unmittelbar nach der Belastung, wobei alle IL-6-Werte kleiner als 10 pg/ml waren (83). Weinstock et al. (103) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis bei der IL-6-Analyse im Serum von 15 Triathleten, die einen im Mittel 68 Minuten andauernden Kurztriathlon absolviert hatten. Sie wiesen einen signifikanten IL-6-Anstieg unmittelbar nach der Belastung nach. Auch hier waren alle IL-6-Konzentrationen kleiner als 6 pg/ml. In darauf folgenden zahlreichen anderen Studien wurde von Anstiegen der IL-6-Konzentration im Hinblick auf Art und der Dauer der Belastung berichtet (s. Abb. 13). Dabei traten IL-6-Anstiege von mehr als dem 8000 fachen des Ruhewertes auf (50). Lange andauernde Laufbelastungen scheinen die höchsten belastungsinduzierten IL-6-Anstiege zu provozieren (s. Abb. 11). Der Peak der IL-6-Konzentration lag dabei unmittelbar am Belastungsende oder kurz danach.

Die Untersuchung der IL-6-Kinetik im Studienabschnitt C ergab Ruhewerte, die mit denen in der Literatur beschriebenen übereinstimmen (17, 9, 61). Auch direkt nach dem Fahrradstufentest befanden sich die IL-6-Werte in einem Konzentrationsbereich, die durchaus zu erwarten waren: $4,68 \pm 2,0$ und einem Maximum bei 8,49 pg/ml (17). Allerdings gab es bei der vorliegenden Studie einen zweiten IL-6-Peak zum Zeitpunkt 45 Minuten nach Belastungsabbruch. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten und steht im Widerspruch zu Literaturangaben (9, 61, 59, 64).

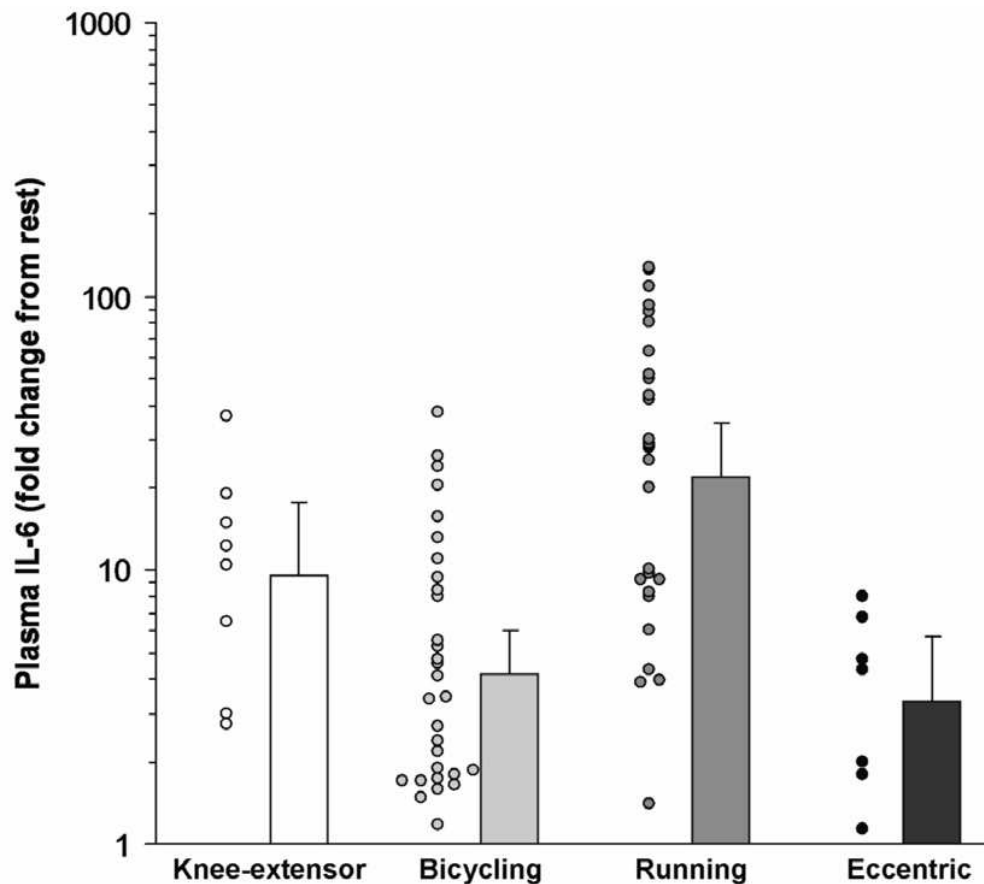


Abbildung 13. Vergleich unterschiedliche Belastungsarten (dynamische Kniestreckung, Fahrradfahren, Laufen und exzentrische Belastung) und Zunahme der Plasma-IL-6 Konzentration, dargestellt als Vielfaches vom Ruhewert, basierend auf 67 Belastungsuntersuchungen (nach Fischer, PC (17))

Die Hauptquelle der belastungsinduzierten IL-6-Ausschüttung ist der kontrahierende Muskel selbst (61). Interleukin-6 wird in der Leber und den Nieren abgebaut und hat eine Plasmahalbwertszeit von nur wenigen Minuten (17). In früheren Studien wurde berichtet, dass eine Adrenalin-Gabe und zu einem IL-6-Peak 1 Stunde nach der Injektion führt (13, 81, 84). Aufgrund der Belastungsstruktur des Stufentest in unserer Studie mit einem hohen Anteil an Stufen, die oberhalb der individuellen anaeroben Schwelle liegen, könnte die erhöhte Konzentration der Epinephrine gegen Ende der Belastung für den 45-Minuten-Peak in der Nachbelastungsphase verantwortlich sein.

CRP-Vollblutbestimmung

Im Studienabschnitt C wurden 3 methodisch verschiedene Ruheblutentnahmen durchgeführt:

- eine intravenöse Blutentnahme mit anschließender Plasmagewinnung
- eine kapilläre Blutentnahme mit anschließender Plasmagewinnung
- eine kapilläre Blutentnahme, wobei das Vollblut in Probendiluent aufgenommen und anschließend tiefgefroren wurde

Die statistische Analyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen allen 3 Messreihen. Die niedrigsten Werte zeigte die Vollblutmethode (c), die höchsten Werte die kapilläre Blutentnahme. Die niedrigen Werte der Vollblutmethode erklären sich aus dem geringeren Plasmaanteil. Arteriell Blut hat noch nicht die Körperpassage durchflossen, so dass CRP evtl. in höherer Konzentration im Plasma vorkommen könnte als in venösem Blut. Dies wäre eine Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte CRP-Konzentration der Kapillarmethode (b) im Vergleich zu den anderen Blutentnahmetechniken.

Zur Beurteilung von Blutproben oder zur Erstellung einer Risikostratifizierung für atherosklerotische Erkrankungen müsste für jede Technik der Probengewinnung ein eigener Wertebereich erstellt werden.

Methodenkritik

Um optimale Ergebnisse zu gewinnen, wurde in den vorliegenden Studienabschnitten von der Präanalytik bis zur Messung darauf geachtet, mögliche Fehlerquellen zu vermeiden. Die Untersuchungen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, d. h. die Umwelteinflüsse (z. B. Temperatur, Luftfeuchtigkeit) wurden möglichst konstant gehalten. Bei der Präanalytik war zu beachten, dass eine unsachgemäße Blutentnahme (z.B. schlechtes Durchmischen von Blutprobe und EDTA) zu verfälschten Werten führen kann, das wurde entsprechend vermieden. Weiterhin war eine korrekte und zügige Weiterverarbeitung der Probe von der Zentrifugation bis zur Aufbewahrung bei -80°C gewährleistet. Die später durchgeführten Analysen wurden genau nach der Arbeitsanleitung, die im Studienabschnitt A entwickelt wurden, durchgeführt und bei den kommerziellen Tests genau nach den Herstelleranweisungen der Händler. Um die Testgenauigkeit zu überprüfen, wurden auch interne und externe Qualitätskontrollen durchgeführt.

Persönliche Messfehler (z. B. Unkonzentriertheit, ungenaues Pipettieren) sind nie gänzlich zu vermeiden, aber es wurde darauf geachtet, diese so gering wie möglich zu halten, in dem z.B. das Laborpersonal entsprechend technisch geschult wurde und für Bedingungen gesorgt wurde, die sauberes und korrektes Arbeiten ermöglichen.

5 Zusammenfassung

IL-6 und CRP sind wichtige Parameter bei der Akute-Phase-Reaktion und spielen eine zentrale Rolle bei der Low-Level-Inflammation. Da körperliche Belastung ebenfalls eine kurzzeitige subklinische Entzündungsreaktion hervorruft, eignen sich beide Parameter zur Beurteilung des Adaptionsvermögens eines Probanden. Voraussetzung für eine messgenaue Analyse sind geeignete Systeme, die zuverlässig und präzise quantitative Messergebnisse liefern.

Im ersten Studienabschnitt wurden für IL-6 und CRP jeweils ein Zweischnitt-Sandwich-ELISA-System entwickelt und optimiert. Die Intra-Assay-Präzision betrug für den IL-6 ELISA im niedrigen Konzentrationsbereich 2,8 % VK und im hohen Konzentrationsbereich 7,7 % VK. Der IL-6-Inter-Assay-Variationskoeffizient war im low-Level-Bereich 3,6% und im high-Level-Bereich 9,7%. Die Sensitivität war nach der Optimierung 0,49 pg IL-6/ ml. Für den CRP-ELISA wurden 3 Konzentrationsbereiche untersucht. Die Intra-Assay-Präzision betrug 5,0% (high Level), 6,2% (middle Level) und 5,0% (low Level). Die Inter-Assay-Präzision betrug 5,2% (high Level), 6,8% (middle Level) und 11,4 % (low Level). Die Sensitivität lag bei 0,03 mg/l. Die Wiederfindung in zwei Verdünnungsstufen (1:2, 1:4) betrug 100% bzw. 98,6%. Die externe Qualitätskontrolle (Instand e.V. Ringversuch) für CRP erreichte alle qualitativen und quantitativen Zielwerte bei einer Bestehensquote von 83,3 bis 91,7%.

Die Belastungsstudie im ersten Studienabschnitt zur Prä-Validierung für die CRP und IL-6-ELISA's wurde mit entsprechenden Referenzmethoden verglichen. Dabei wurden für CRP nur die Ruhewerte verglichen. Die beiden Messreihen waren signifikant verschieden. Für IL-6 wurden zusätzlich die Nachbelastungswerte ermittelt und ebenfalls wie die Vorbelastungswerte verglichen. Alle 4 Messreihen ergaben signifikante Unterschiede.

Der Vergleich der kapillären und intravenösen Blutentnahmetechnik im Studienabschnitt B ergab für IL-6 keine Unterschiede und für CRP hochsignifikante Unterschiede.

Die Untersuchungen der Kinetiken für CRP und IL-6 ergab im Studienabschnitt C einen signifikant erhöhten Nachbelastungswert für CRP nach 24 Stunden. Nach 1, 2 und 6 Stunden waren die CRP-Konzentrationen nicht erhöht. Beim IL-6, das diesmal mit der Referenzmethode bestimmt wurde, ergaben sich signifikante Anstiege, nach der 50 Watt-Stufe und bei allen Nachbelastungswerten (1 Minute und 45 Minuten post). Der IL-6-Peak trat interessanterweise erst nach 45 Minuten auf. Es wurde diskutiert, ob dieses unerwartet späte IL-6-Maximum durch die Belastungsstruktur bedingt, vermehrt ausgeschütteten Stresshormone induziert worden war.

Im Ausblick könnten weitere Studien auf der Basis dieser Methodenevaluation folgen. Der von uns entwickelte hochsensitive CRP-Sandwich-ELISA hatte sich als geeignetes Analysesystem erwiesen. Er erfüllte die klassischen Gütekriterien zur Überprüfung quantitativer Forschungsergebnisse und ermöglicht deshalb, dass zukünftig einfach und kostengünstig ultrasensitive CRP-Bestimmungen in Quer- und Längsschnittstudien durchgeführt werden können. Mögliche Einsatzbereiche wären Risikostratifizierung für Arteriosklerose oder Nachweis von Überlastungszuständen.

IL-6 wird in der Literatur auch als Myokin oder „Belastungsfaktor“ bezeichnet. Da er auch in den Glykogen- und Fettsäurestoffwechsel eingreift, bieten sich interessante Fragestellungen, die durch die Verfügbarkeit dieses klinisch evaluierten IL-6-Analysesystems untersucht werden könnten.

6 Literatur

- (1) Abramson, J. L. & Vaccarino, V. (2002). Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch Intern Med*, 162(11), 1286-1292.
- (2) Agrawal, A., Samols, D. & Kushner, I. (2003). Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by facilitating the binding of C/EBPbeta to the promoter. *Mol Immunol*, 40(6), 373-380.
- (3) Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. & Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*, 59, 783-836.
- (4) Balkwill, F. (1989). Cytokines in cancer therapy. *Oxford University Press*, 8-87, 150-181.
- (5) Bauer, J., Hohagen, F., Ebert, T., Timmer, J., Ganter, U., Krieger, S. et al. (1994). Interleukin-6 serum levels in healthy persons correspond to the sleep-wake cycle. *Clin Invest*, 72(4), 315.
- (6) Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18), 6934-6938.
- (7) Bowcock, A. M., Kidd, J. R., Lathrop, G. M., Daneshvar, L., May, L. T., Ray, A. et al. (1988). The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21. *Genomics*, 3(1), 8-16.
- (8) Bruunsgaard, H. (2005). Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol*, 78(4), 819-835.
- (9) Bruunsgaard, H., Galbo, H., Halkjaer-Kristensen, J., Johansen, T. L., MacLean, D. A. & Pedersen, B. K. (1997). Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol*, 499 (Pt 3), 833-841.
- (10) Burke, A. P., Tracy, R. P., Kolodgie, F., Malcom, G. T., Zieske, A., Kutys, R. et al. (2002). Elevated C-reactive protein values and atherosclerosis in sudden coronary death: association with different pathologies. *Circulation*, 105(17), 2019-2023.
- (11) Castell, L. M., Poortmans, J. R., Leclercq, R., Brasseur, M., Duchateau, J. & Newsholme, E. A. (1997). Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 75(1), 47-53.

-
- (12) Damas, P., Ledoux, D., Nys, M., Vrindts, Y., De Groote, D., Franchimont, P. et al. (1992). Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg*, 215(4), 356-362.
- (13) DeRijk, R. H., Boelen, A., Tilders, F. J. & Berkenbosch, F. (1994). Induction of plasma interleukin-6 by circulating adrenaline in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 19(2), 155-163.
- (14) Dufhues, G. (1991). Posttranslationale Modifikation von humanem IL-6: Charakterisierung der Kohlenhydrat-Seitenketten, ihre Lokalisation und Funktion *Dissertation, Institut für Biochemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen*.
- (15) FAD, U. (2001). Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation.
- (16) FAD, U. (2005). Review Criteria for Assessment of C- Reactive Protein (CRP), High Sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP) and Cardiac C-Reactive Protein (cCRP) Assays.
- (17) Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev*, 12, 6-33.
- (18) Fischer, C. P., Berntsen, A., Perstrup, L. B., Eskildsen, P. & Pedersen, B. K. (2007). Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. *Scand J Med Sci Sports*, 17(5), 580-587.
- (19) Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S. et al. (1998). The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, 102(7), 1369-1376.
- (20) Floyd-Smith, G., Whitehead, A. S., Colten, H. R. & Francke, U. (1986). The human C-reactive protein gene (CRP) and serum amyloid P component gene (APCS) are located on the proximal long arm of chromosome 1. *Immunogenetics*, 24(3), 171-176.
- (21) Gabay, C. & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340(6), 448-454.
- (22) Gabriel, H. (2000). Die Akute-Phase-Reaktion. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 51(1), 31-32.
- (23) Galle, J. (2004). [Atherosclerosis and arteriitis: implications for therapy of cardiovascular disease]. *Herz*, 29(1), 4-11.
- (24) Grutzmeier, S. & von Schenck, H. (1989). Four immunochemical methods for measuring C-reactive protein in plasma compared. *Clin Chem*, 35(3), 461-463.

-
- (25) Hack, C. E., De Groot, E. R., Felt-Bersma, R. J., Nuijens, J. H., Strack Van Schijndel, R. J., Eerenberg-Belmer, A. J. et al. (1989). Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*, 74(5), 1704-1710.
- (26) Haegeman, G., Content, J., Volckaert, G., Derynck, R., Tavernier, J. & Fiers, W. (1986). Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur J Biochem*, 159(3), 625-632.
- (27) Hansson, G. K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352(16), 1685-1695.
- (28) Haralambie, G. (1969). Serum glycoproteins and physical exercise. *Clin Chim Acta*, 26(2), 287-291.
- (29) Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2), 297-314.
- (30) Helle, M., Boeije, L., de Groot, E., de Vos, A. & Aarden, L. (1991). Sensitive ELISA for interleukin-6. Detection of IL-6 in biological fluids: synovial fluids and sera. *J Immunol Methods*, 138(1), 47-56.
- (31) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T. et al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(6092), 73-76.
- (32) Horn, P. S., Feng, L., Li, Y., & Pesce, A. J. (2001). Effect of outliers and nonhealthy individuals on reference interval estimation. *Clin Chem*, 47(12), 2137-2145.
- (33) Kaehler, J., Osterholz, S., Patten, M., Koester, R. & Meinertz, T. (2002). [Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Dtsch Med Wochenschr*, 127(3), 94-99.
- (34) Kaiser, H. (1965). Zum Problem der Nachweisgrenze. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 209(1), 1-18.
- (35) Kasapis, C., & Thompson, P. D. (2005). The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*, 45(10), 1563-1569.
- (36) Kayaba, K., Ishikawa, S., Gotoh, T., Nago, N., Kajii, E., Nakamura, Y. et al. (2000). Five-year intra-individual variability in C-reactive protein levels in a Japanese population-based study: the Jichi Medical School Cohort Study at Yamato, 1993-1998. *Jpn Circ J*, 64(4), 303-308.
- (37) Kemeny, D. M. (1992). Titration of antibodies. *J Immunol Methods*, 150(1-2), 57-76.

-
- (38) Kemeny, D. M. (1994). ELISA: Anwendung des Enzyme linked Immunosorbent Assay im biologische/medizinischen Labor. *Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, Jena, New York*.
- (39) Kingsmore, S. F., Watson, M. L., Howard, T. A. & Seldin, M. F. (1989). A 6000 kb segment of chromosome 1 is conserved in human and mouse. *Embo J*, 8(13), 4073-4080.
- (40) Kleemann, R., Gervois, P. P., Verschuren, L., Staels, B., Princen, H. M. & Kooistra, T. (2003). Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood*, 101(2), 545-551.
- (41) Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., Fischer, H. G., Lowel, H., Doring, A. et al. (1999). C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*, 99(2), 237-242.
- (42) Kriz, K., Ibraimi, F., Lu, M., Hansson, L. O. & Kriz, D. (2005). Detection of C-reactive protein utilizing magnetic permeability detection based immunoassays. *Anal Chem*, 77(18), 5920-5924.
- (43) Lansdorp, P. M., Aarden, L. A., Calafat, J. & Zeiljemaker, W. P. (1986). A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol*, 132, 105-113.
- (44) Libby, P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91(11), 2844-2850.
- (45) Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.
- (46) Liesen, H., Dufaux, B. & Hollmann, W. (1977). Modifications of serum glycoproteins the days following a prolonged physical exercise and the influence of physical training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 37(4), 243-254.
- (47) MacGregor, A. J., Gallimore, J. R., Spector, T. D. & Pepys, M. B. (2004). Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem*, 50(1), 130-134.
- (48) MacLeod, C. M. a. A, O.T. (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. III. Immunological properties of the C-reactive protein and its differation from normal blood proteins. *J. Exper. Med.*, 73(191), 191-200.

-
- (49) Macy, E. M., Hayes, T. E. & Tracy, R. P. (1997). Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem*, 43(1), 52-58.
- (50) Margeli, A., Skenderi, K., Tsironi, M., Hantzi, E., Matalas, A. L., Vrettou, C. et al. (2005). Dramatic elevations of interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(7), 3914-3918.
- (51) May, L. T., Santhanam, U., Tatter, S. B., Bhardwaj, N., Ghrayeb, J. & Sehgal, P. B. (1988). Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. *Biochem Biophys Res Commun*, 152(3), 1144-1150.
- (52) Meier-Ewert, H. K., Ridker, P. M., Rifai, N., Price, N., Dinges, D. F. & Mullington, J. M. (2001). Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem*, 47(3), 426-430.
- (53) Meyer, T., Gabriel, H. H., Ratz, M., Müller, H. J. & Kindermann, W. (2001). Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc*, 33(4), 549-555.
- (54) Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T. W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*, 42(1-3), 23-30.
- (55) Nishi, N., Matuo, Y., Muguruma, Y., Yoshitake, Y., Nishikawa, K. & Wada, F. (1985). A human prostatic growth factor (hPGF): partial purification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, 132(3), 1103-1109.
- (56) Northoff, H. & Berg, A. (1991). Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med*, 12 Suppl 1, S9-15.
- (57) Oliveira, E. B., Gotschlich, C., & Liu, T. Y. (1979). Primary structure of human C-reactive protein. *J Biol Chem*, 254(2), 489-502.
- (58) Osmand, A. P., Friedenson, B., Gewurz, H., Painter, R. H., Hofmann, T., & Shelton, E. (1977). Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(2), 739-743.
- (59) Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J. N. & Pedersen, B. K. (1998). A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol*, 513 (Pt 3), 889-894.

-
- (60) Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P. & Pedersen, B. K. (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*, 515 (Pt 1), 287-291.
- (61) Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S. & Pedersen, B. K. (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol*, 508 (Pt 3), 949-953.
- (62) Ostrowski, K., Schjerling, P. & Pedersen, B. K. (2000). Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol*, 83(6), 512-515.
- (63) Pankow, J. S., Folsom, A. R., Cushman, M., Borecki, I. B., Hopkins, P. N., Eckfeldt, J. H. et al. (2001). Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*, 154(3), 681-689.
- (64) Parizkova, J. (1974). Particularities of lean body mass and fat development in growing boys as related to their motor activity. *Acta Paediatr Belg*, 28 suppl, 233-243.
- (65) Peake, J. M., Suzuki, K., Wilson, G., Hordern, M., Nosaka, K., Mackinnon, L. et al. (2005). Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. *Med Sci Sports Exerc*, 37(5), 737-745.
- (66) Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., 3rd, Criqui, M. et al. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107(3), 499-511.
- (67) Pedersen, B. K., & Fischer, C. P. (2007). Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10(3), 265-271.
- (68) Perlmann, H. P. P. (1994). Enzym-Linked Immunosorbent Assay. *Cell Biology: A Laboratory Handbood*, 2, 438-445.
- (69) Petersen, A. M. & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*, 98(4), 1154-1162.
- (70) Poupart, P., Vandenabeele, P., Cayphas, S., Van Snick, J., Haegeman, G., Kruys, V. et al. (1987). B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF). *Embo J*, 6(5), 1219-1224.
- (71) Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J. & Hennekens, C. H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101(15), 1767-1772.

-
- (72) Rifai, N., Ballantyne, C. M., Cushman, M., Levy, D. & Myers, G. L. (2006). Point: high-sensitivity C-reactive protein and cardiac C-reactive protein assays: is there a need to differentiate? *Clin Chem*, 52(7), 1254-1256.
- (73) Ritchie, D. G. & Fuller, G. M. (1983). Hepatocyte-stimulating factor: a monocyte-derived acute-phase regulatory protein. *Ann N Y Acad Sci*, 408, 490-502.
- (74) Robey, F. A., Jones, K. D., Tanaka, T. & Liu, T. Y. (1984). Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem*, 259(11), 7311-7316.
- (75) Ronsen, O., Holm, K., Staff, H., Opstad, P. K., Pedersen, B. K., & Bahr, R. (2001). No effect of seasonal variation in training load on immuno-endocrine responses to acute exhaustive exercise. *Scand J Med Sci Sports*, 11(3), 141-148.
- (76) Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340(2), 115-126.
- (77) Scharhag, J., Meyer, T., Gabriel, H. H., Schlick, B., Faude, O. & Kindermann, W. (2005). Does prolonged cycling of moderate intensity affect immune cell function? *Br J Sports Med*, 39(3), 171-177; discussion 171-177.
- (78) Sehgal, P. B., Zilberstein, A., Ruggieri, R. M., May, L. T., Ferguson-Smith, A., Slate, D. L. et al. (1986). Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(14), 5219-5222.
- (79) Shalaby, M. R., Waage, A., Aarden, L. & Espevik, T. (1989). Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clin Immunol Immunopathol*, 53(3), 488-498.
- (80) Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J. et al. (1989). IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol*, 142(2), 549-553.
- (81) Sondergaard, S. R., Ostrowski, K., Ullum, H. & Pedersen, B. K. (2000). Changes in plasma concentrations of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonists in response to adrenaline infusion in humans. *Eur J Appl Physiol*, 83(1), 95-98.
- (82) Sothern, R. B., Roitman-Johnson, B., Kanabrocki, E. L., Yager, J. G., Roodell, M. M., Weatherbee, J. A. et al. (1995). Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol*, 95(5 Pt 1), 1029-1035.
- (83) Sprenger, H., Jacobs, C., Nain, M., Gressner, A. M., Prinz, H., Wesemann, W. et al. (1992). Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immunol Immunopathol*, 63(2), 188-195.

-
- (84) Steensberg, A., Toft, A. D., Schjerling, P., Halkjaer-Kristensen, J. & Pedersen, B. K. (2001). Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinephrine. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(3), C1001-1004.
- (85) Stegmann, H., Kindermann, W. & Schnabel, A. (1981). Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int J Sports Med*, 2(3), 160-165.
- (86) Szalai, A. J., van Ginkel, F. W., Wang, Y., McGhee, J. R. & Volanakis, J. E. (2000). Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. *J Immunol*, 165(2), 1030-1035.
- (87) Takai, Y., Wong, G. G., Clark, S. C., Burakoff, S. J. & Herrmann, S. H. (1988). B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 140(2), 508-512.
- (88) Tegtmeyer, F. K., Otte, J. & Horn, C. (1990). [Determination of C-reactive protein (CRP) in capillary blood--a comparison with the CPR level in venous serum]. *Monatsschr Kinderheilkd*, 138(8), 443-445.
- (89) Terry, C. F., Loukaci, V. & Green, F. R. (2000). Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 275(24), 18138-18144.
- (90) Tillett, W. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*, 52, 561-571.
- (91) Van Snick, J., Vink, A., Cayphas, S. & Uyttenhove, C. (1987). Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas. *J Exp Med*, 165(3), 641-649.
- (92) Verma, S., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Li, S. H., Wang, C. H., Fedak, P. W., et al. (2003). C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126(6), 1886-1891.
- (93) Verma, S., Kuliszewski, M. A., Li, S. H., Szmitko, P. E., Zucco, L., Wang, C. H. et al. (2004). C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, 109(17), 2058-2067.
- (94) Verma, S., Wang, C. H., Li, S. H., Dumont, A. S., Fedak, P. W., Badiwala, M. V. et al. (2002). A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*, 106(8), 913-919.

-
- (95) Vgontzas, A. N., Papanicolaou, D. A., Bixler, E. O., Lotsikas, A., Zachman, K., Kales, A. et al. (1999). Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(8), 2603-2607.
- (96) Vigushin, D. M., Pepys, M. B. & Hawkins, P. N. (1993). Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest*, 91(4), 1351-1357.
- (97) Volanakis, J. E. (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol*, 38(2-3), 189-197.
- (98) Volanakis, J. E. & Kaplan, M. H. (1971). Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med*, 136(2), 612-614.
- (99) Volanakis, J. E. & Narkates, A. J. (1981). Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement. *J Immunol*, 126(5), 1820-1825.
- (100) Wadham, C., Albanese, N., Roberts, J., Wang, L., Bagley, C. J., Gamble, J. R. et al. (2004). High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation*, 109(17), 2116-2122.
- (101) Walsh, M. T., Divane, A. & Whitehead, A. S. (1996). Fine mapping of the human pentraxin gene region on chromosome 1q23. *Immunogenetics*, 44(1), 62-69.
- (102) Weight, L. M., Alexander, D. & Jacobs, P. (1991). Strenuous exercise: analogous to the acute-phase response? *Clin Sci (Lond)*, 81(5), 677-683.
- (103) Weinstock, C., Konig, D., Harnischmacher, R., Keul, J., Berg, A. & Northoff, H. (1997). Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response. *Med Sci Sports Exerc*, 29(3), 345-354.
- (104) Wolter T., G. C., Vetter V. & Bauer G. (1997). Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows improvement of the serodiagnosis of infections. *. Clin Lab*, 43.
- (105) Wu, T. L., Tsao, K. C., Chang, C. P., Li, C. N., Sun, C. F. & Wu, J. T. (2002). Development of ELISA on microplate for serum C-reactive protein and establishment of age-dependent normal reference range. *Clin Chim Acta*, 322(1-2), 163-168.
- (106) Yue, C. C., Muller-Greven, J., Dailey, P., Lozanski, G., Anderson, V., & Macintyre, S. (1996). Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 271(36), 22245-22250.

- (107) Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J. H., & Revel, M. (1986). Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *Embo J*, 5(10), 2529-2537.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 35: Anthropometrische Daten der Probanden aus Studienabschnitt A

P.b. Nr.	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI	Körperfett (%)
1	40	68,5	1,66	24,7	24,7
2	40	90	1,78	28,4	22,6
3	57	64	1,63	24,1	17,2
4	35	83,8	1,86	24,2	18,9
5	39	96	1,6	37,5	26,0
6	47	86	1,74	28,4	23,8
7	28	90	1,81	27,5	15,5
8	52	70	1,69	24,5	18,6
9	52	65,5	1,77	20,9	9,7
10	50	98,5	1,68	34,9	29,6
11	35	59	1,66	21,4	15,3
12	54	70	1,6	27,4	25,2
13	46	57	1,64	21,2	18,1
14	26	72	1,81	22,0	14,9
15	22	56,5	1,66	20,1	10,2
16	36	62	1,73	21,0	14,2
17	53	87,8	1,79	27,4	19,7
18	55	74	1,63	27,9	22,1
19	37	62,2	1,6	24,3	18,7
20	49	60	1,6	23,4	18,7
21	18	67	1,78	21,2	15,2
22	46	55,5	1,63	20,9	15,5
23	53	63	1,69	22,1	16,8
24	44	96	1,63	36,1	27,0
25	20	65,5	1,78	20,7	12,0
26	33	86	1,86	24,9	16,8
27	45	59,8	1,64	22,2	8,2
28	48	66	1,64	24,5	18,1
29	39	72	1,68	25,5	20,4
30	51	69	1,60	27,0	22,8
31	52	60,0	1,68	21,3	18,9
32	21	61,5	1,62	23,4	18,6
33	23	70	1,77	22,3	12,2
34	45	63,0	1,65	23,1	14,5
35	27	60	1,61	23,2	21,2
36	25	69,0	1,77	22,0	14,2
37	27	90,0	1,79	28,1	16,5
38	52	59,5	1,67	21,3	16,8
39	21	59,0	1,69	20,7	16,3
40	22	70,0	1,82	21,1	13,0
41	56	62,5	1,56	25,7	19,5
42	55	65,5	1,83	19,6	11,8
43	43	75,0	1,54	31,6	22,6
44	45	59,0	1,66	21,4	15,7
45	30	64,5	1,69	22,6	17,0
46	55	68,0	1,81	20,8	12,0
Mittelwert	39,9	70,2	1,69	24,5	17,9
Standard- abweichung	12,0	12,0	0,08	4,2	4,7

Tabelle 36: Leistungsdaten der Probanden aus Studienabschnitt A

P.b. Nr.	VO2 max [ml min ⁻¹ kg ⁻¹]	Hf max [Hz]	Hfr IAS [Hz]	Laktat max [mmol l-1]	Laktat IAS [mmol l-1]	Leistung max W]	Leistung IAS [W]	Leistung relativ [W kg-1]
1	2172	177	146	6,9	4,0	125	83	1,21
2	2040	182	163	7,4	3,1	108,33	52	0,58
3	1621	162	135	8,9	4,0	79,17	47	0,73
4	2585	165	150	6,9	3,0	158,33	88	1,05
5	2501	172	142	7,2	3,1	133	85	0,9
6	2475	181	159	8,0	4,0	141,67	99	1,15
7	3025	177	142	4,7	2,5	158,33	108	1,2
8	2422	155	123	4,9	2,5	133,33	89	1,27
9	2051	167	136	10,4	3,0	117	50	0,8
10	2140	172	150	5,6	3,8	93,66	70	0,71
11	2110	181	149	9,3	3,4	116,6	55	0,93
12	2014	172	142	6,6	3,2	117	83	1,2
13	2309	155	105	8,2	2,6	116,6	58	1,02
14	2801	190	152	10,0	3,8	175	100	1,39
15	2589	203	158	11,3	3,8	142	81	1,4
16	2679	168	147	8,7	3,7	183	130	2,1
17	3080	180		7,6		217		
18	1571	140	106	4,5	1,4	87,5	30	0,41
19	2007	181	135	8,8	3,1	117	70	1,1
20	2109	172	139	8,7	3,1	108	55	0,9
21	2931	185	143	8,4	4,0	175	124	1,85
22	2019	171	144	6,2	2,6	125	84	1,5
23	1672	172	136	4,8	2,0	100	61	1,0
24	2004	182	140	6,7	2,5	104,17	55	0,57
25	4217	212	173	9,9	4,4	233	165	2,5
26	4178	192	153	8,4	3,1	258	170	2,0
27	1948	184	157	7,8	3,4	113	72	1,1
28	2832	184	161	9,5	3,5	208	123	2,1
29	2493	189	161	10,7	4,2	158	115	1,6
30	1965	176	148	5,3	2,7	125	89	1,3
31	1973	173	148	10,3	3,9	125	90	1,5
32	2105	188	145	10,5	3,1	125	80	1,3
33	3645	185	138	10,0	3,8	208,33	115	1,64
34	1760	180	166	7,8	3,3	87	52	0,8
35	1960	176	137	15,0	4,6	112,5	70	1,17
36	3835	192	154	13,2	3,8	238	149	2,2
37	4364	176	136	8,3	3,6	258	161	1,8
38	1949	177	120	7,0	2,4	108	68	1,1
39	2657	172	144	8,4	3,4	163	112	1,9
40	3566	205	171	8,6	2,7	225	160	2,3
41	2140	155	125	8,8	3,4	113	55	0,9
42	2134	150	117	5,6	2,5	116,67	69	1,05
43	1888					75		
44	2315	173	147	8,0	2,7	158	115	1,9
45	3251	202	176	15,3	4,3	213	145	2,2
46	3269	180	148	6,7	2,1	200	138	2,0
Mittelwert	2614	181	147	8,8	3,3	156	105	1,6
Standard- abweichung	710,6	14,3	15,85	2,4	0,7	49,3	36,1	0,52

Tabelle 37: Anthropometrische Daten der Probanden aus Studienabschnitt B

P.b. Nr.	Alter	Gewicht	Größe	BMI	Körperfett	Waist to Hip
1	28	77,4	188	21,90	8,7	0,79
2	27	80,6	192	21,86	8,1	0,81
3	28	84,0	175	27,43	8,7	0,91
4	20	79,2	195	20,83	9,1	0,81
5	25	83,2	184	24,58	14,6	0,89
6	23	85,8	181	26,19	14,0	0,94
7	27	75,8	177	24,20	11,8	0,91
8	26	64,0	170	22,15	15,5	0,74
9	24	70,2	176	22,66	11,6	0,86
10	24	77,4	183	23,11	10,4	0,87
11	25	87,0	174	28,74	16,8	0,89
12	66	87,8	175	28,67	14,6	0,93
13	23	72,0	181	21,98	9,8	0,81
14	23	50,0	160	19,53	8,2	0,69
15	25	84,6	188	23,94	11,4	0,89
16	22	53,2	165	19,54	11,2	0,76
17	23	90,2	189	25,25	14,2	0,95
18	22	54,0	166	19,60	12,6	0,74
19	22	55,8	160	21,80	14,0	0,84
20	24	65,4	167	23,45	15,9	0,73
21	48	75,6	160	29,53	22,1	0,87
22	27	59,6	173	19,91	9,7	0,72
23	66	64,6	160	25,23	19,7	0,83
24	35	60,8	173	20,32	15,9	0,75
25	22	59,6	173	19,91	9,0	0,71
26	28	59,4	172	20,08	5,8	0,78
27	68	73,4	172	24,81	16,0	0,94
28	21	75,6	197	19,48	9,5	0,82
29	25	75,6	183	22,58	12,2	0,85
30	22	56,0	168	19,84	10,2	0,83
31	23	92,6	192	25,12	16,4	0,84
32	24	66,8	180	20,62	14,2	0,85
33	64	75,2	166	27,29	18,3	0,95
34	22	54,6	162	20,81	13,8	0,75
35	24	53,0	157	21,50	14,2	0,71
36	22	76,6	178	24,18	8,7	0,87
37	29	66,8	177	21,32	10,0	0,83
38	56	65,0	157	26,37	13,8	0,80
39	25	52,8	162	20,12	13,1	0,79
40	25	52,6	164	19,56	3,0	0,80
41	25	64,6	164	24,02	18,1	0,75
42	24	75,0	174	24,77	14,8	0,83
43	25	58,0	166	21,05	13,4	0,80
44	34	75,6	171	25,85	12,7	0,87
45	50	84,6	184	24,99	17,6	0,90
46	25	67,8	176	21,89	9,4	0,84
47	24	84,0	186	24,28	11,6	0,85
48	25	79,0	174	26,09	10,4	0,88
49	23	69,0	170	23,88	18,1	0,87
50	48	92,4	186	26,71	15,7	0,93
51	64	75,2	181	22,95	10,8	0,94
52	21	82,0	188	23,20	13,2	0,90
53	17	55,8	171	19,08	8,4	0,81
54	25	78,0	171	26,68	21,6	0,71
55	60	79,8	180	24,63	16,6	0,87

56	24	59,2	173	19,78	16,6	0,80
57	32	82,6	181	25,21	8,1	0,83
58	25	79,2	191	21,71	9,5	0,83
59	68	77,8	174	25,70	14,0	0,92
60	22	56,4	161	21,76	11,0	0,77
61	41	61,8	172	20,89	17,3	0,77
62	25	63,2	173	21,12	10,2	0,73
63	25	69,8	171	23,87	9,5	0,87
64	44	65,4	167	23,45	17,9	0,86
65	52	50,0	164	18,59	6,3	0,74
66	24	81,2	176	26,21	16,4	0,98
67	68	77,6	177	24,77	16,7	0,99
68	22	63,4	170	21,94	10,7	0,74
69	37	62,2	160	24,30	18,7	0,83
70	28	78,2	178	24,68	11,6	0,84
71	26	65,4	166	23,73	14,7	0,86
72	46	82,2	172	27,79	18,8	1,02
73	40	88,4	179	27,59	17,7	0,93
74	54	77,4	186	22,37	14,5	0,95
75	27	75,6	179	23,60	12,0	0,86
76	28	55,4	163	20,85	15,3	0,77
77	24	70,0	178	22,09	15,2	0,87
78	34	90,0	187	25,74	8,9	0,84
79	29	56,8	175	18,55	4,5	0,74
80	39	57,2	160	22,34	16,3	0,86
81	25	85,4	177	27,26	18,2	0,88
82	25	59,2	165	21,75	12,3	0,84
83	33	86,0	186	24,86	16,8	0,93
84	38	77,8	165	28,58	22,4	0,82
85	43	78,2	175	25,54	17,4	0,95
86	23	69,2	179	21,60	10,4	0,87
87	22	61,0	172	20,62	16,4	0,80
88	24	79,4	184	23,45	8,4	0,84
89	24	73,8	185	21,56	6,0	0,85
90	23	75,2	176	24,28	12,9	0,89
91	20	71,8	176	23,18	15,2	0,84
92	44	93,2	189	26,09	15,7	0,94
93	48	65,0	160	25,39	18,2	0,96
94	23	98,2	177	31,34	18,0	0,88
95	49	60,4	167	21,66	14,9	0,82
96	20	77,0	188	21,79	9,4	0,83
97	26	79,2	180	24,44	9,8	0,88
98	24	60,2	159	23,81	18,4	0,74
99	27	71,0	166	25,77	12,3	0,84
100	27	78,2	176	25,25	9,8	0,85
101	66	84,6	169	29,62	18,7	1,01
102	24	82,4	187	23,56	10,8	0,80
103	63	65,2	161	25,15	19,7	0,86
104	27	78,8	176	25,44	12,0	0,84
105	23	78,8	187	22,53	9,8	0,87
106	23	81,0	180	25,00	12,0	0,82
107	54	90,4	179	28,21	16,8	0,93
108	42	79,8	180	24,63	15,2	0,89
109	34	75,2	180	23,21	8,4	0,85
110	23	52,8	170	18,27	12,7	0,70
111	24	66,4	171	22,71	16,0	0,88
112	27	78,4	184	23,16	14,6	0,87
113	26	70,2	179	21,91	11,0	0,81

114	18	63,4	160	24,77	20,9	0,83
115	21	84,6	193	22,71	12,9	0,82
116	24	69,8	175	22,79	13,0	0,82
117	24	61,0	168	21,61	15,1	0,75
118	21	66,2	169	23,18	19,4	0,75
119	24	80,6	185	23,55	13,8	0,81
120	25	67,2	174	22,20	11,0	0,83
121	21	62,2	165	22,85	12,9	0,74
122	32	92,4	177	29,49	17,5	0,88
123	24	86,6	192	23,49	15,2	0,84
124	24	61,6	160	24,06	19,4	0,80
125	20	73,6	176	23,76	19,8	0,74
126	30	83,0	182	25,06	18,0	0,83
127	33	75,2	186	21,74	9,4	0,82
128	25	80,2	190	22,22	10,2	0,81
129	24	43,8	154	18,47	10,2	0,77
130	26	73,8	181	22,53	17,9	0,88
131	23	79,8	190	22,11	13,3	0,82
132	48	85,2	178	26,89	18,1	0,97
133	56	59,8	163	22,51	19,4	0,87
134	30	87,0	185	25,42	17,7	0,89
135	22	67,0	171	22,91	16,4	0,73
136	22	75,2	163	28,30	24,5	0,91
137	23	78,8	174	26,03	15,5	0,87
138	28	113,0	195	29,72	19,7	0,94
139	26	85,4	180	26,36	16,9	0,92
140	48	70,6	155	29,39	22,9	0,92
141	44	62,0	165	22,77	19,0	0,80
142	55	58,0	166	21,05	22,0	0,87
143	26	71,5	184	21,12	11,0	0,86
144	25	67,5	181	20,60	9,5	0,86
145	25	73,8	178	23,29	15,3	0,88
146	36	75,0	177	23,94	14,9	0,87
147	47	80,2	177	25,60	18,4	0,92
148	25	94,5	192	25,64	14,5	0,85
149	20	74,2	192	20,13	8,9	0,90
150	23	55,6	168	19,70	12,2	0,72
151	26	92,2	191	25,27	15,7	0,87
152	22	55,0	163	20,70	12,9	0,75
153	28	99,6	193	26,74	18,2	0,87
154	28	93,8	191	25,71	14,5	0,88
155	27	92,6	186	26,77	19,5	0,96
156	56	91,0	177	29,05	19,2	0,97
157	67	68,4	158	27,40	19,7	0,88
158	68	68,0	176	21,95	15,6	1,01
159	23	73,4	181	22,41	14,3	0,85
160	27	80,2	185	23,43	12,2	0,81
161	22	62,8	161	24,23	17,5	0,77
162	21	76,0	191	20,83	7,1	0,81
163	25	62,0	181	18,92	5,1	0,88
164	25	64,0	170	22,15	10,6	0,81
165	22	58,8	155	24,48	11,6	0,89
166	24	55,0	169	19,26	13,8	0,70
167	24	76,2	176	24,60	15,3	0,79
168	21	57,8	167	20,73	12,7	0,73
169	23	93,0	188	26,31	14,2	0,88
170	22	52,4	160	20,47	11,5	0,75
171	23	56,6	166	20,54	13,1	0,74

172	25	96,8	194	25,72	15,6	0,84
173	29	77,0	194	20,46	8,7	0,85
174	23	68,8	183	20,54	10,8	0,82
175	22	53,8	170	18,62	10,6	0,70
176	22	70,4	167	25,24	22,8	0,73
177	23	94,8	192	25,72	18,6	0,83
178	25	61,0	170	21,11	18,4	0,81
179	23	102,0	191	27,96	21,9	0,82
180	21	53,8	158	21,55	15,5	0,77
181	27	64,0	172	21,63	16,8	0,75
182	22	71,4	173	23,86	10,2	0,82
183	21	64,4	167	23,09	11,8	0,76
184	23	65,0	174	21,47	16,6	0,77
185	24	70,8	177	22,60	20,9	0,81
186	21	61,4	171	21,00	17,3	0,72
187	23	76,6	181	23,38	16,3	0,83
188	21	50,2	157	20,37	7,3	0,74
189	20	66,0	167	23,67	15,9	0,71
190	23	69,8	167	25,03	18,9	0,82
191	22	84,0	174	27,75	17,5	0,70
192	23	78,8	177	25,15	19,4	0,76
193	25	90,6	189	25,36	17,0	0,84
194	23	66,6	171	22,78	11,4	0,83
195	23	90,2	190	24,99	12,2	0,85
196	23	85,0	185	24,84	11,4	0,87
197	27	82,2	182	24,82	18,6	0,75
198	47	107,0	174	35,34	25,3	0,89
199	64	89,6	165	32,91	22,5	0,82
200	22	80,2	174	26,49	20,6	0,83
201	60	76,8	165	28,21	23,2	0,77
202	20	54,4	165	19,98	7,3	0,73
203	24	61,4	176	19,82	8,2	0,84
204	29	53,6	163	20,17	13,8	0,70
205	28	63,0	164	23,42	20,9	0,79
Mittelwert	30	72,8	175	23,62	14,3	0,83
Standard- abweichung	13	12,6	10	2,88	4,3	0,07

Tabelle 38: IL-6 und CRP-Werte der Probanden aus Studienabschnitt B

P.b. Nr.	IL6_kapillär [pg/ml]	IL6_intravenös [pg/ml]	CRP_kapillär [mg/l]	CRP_intravenös [mg/l]
1	0,59	1,85	0,23	0,22
2	0,27	0,41	0,29	0,27
3	500,00	500,00	4,53	3,73
4	0,28	1,13	17,25	13,01
5	2,72	0,31	0,64	0,61
6	0,94	0,79	0,19	0,15
7	0,19	0,31	0,46	0,45
8	4,86	5,87	23,32	22,11
9	3,51	1,51	3,96	3,78
10	0,36	0,31	0,26	0,23
11	0,23	1,03	1,34	1,24
12	114,08	117,34	0,21	0,16
13	1,41	0,72	0,86	0,91
14	0,46	0,72	2,30	2,15
15	250,32	270,58	0,10	0,13
16	0,31	1,51	3,50	2,87
17	68,10	62,10	1,85	1,78
18	0,31	0,04	0,57	0,53
19	0,27	0,12	4,00	4,41
20	0,12	1,73	5,72	5,72
21	5,40	4,86	4,90	4,79
22	0,27	0,36	1,48	1,50
23	0,65	0,27	4,86	4,96
24	0,94	1,84	0,40	0,43
25	33,65	25,80	0,96	0,92
26	0,58	0,27	0,15	0,14
27	0,79	1,96	4,18	3,98
28	2,09	2,09	4,90	4,42
29	12,22	11,18	1,33	1,34
30	6,37	6,48	46,24	34,18
31	8,37	6,22	0,43	0,40
32	0,53	2,72	0,25	0,27
33	1,22	2,09	2,76	2,57
34	0,19	0,31	2,72	2,77
35	0,19	0,01	3,49	2,04
36	1,13	2,33	0,04	0,01
37	1,85	1,74	0,26	0,22
38	0,41	0,09	1,02	1,02
39	0,79	1,31	1,67	1,52
40	0,37	1,42	0,27	0,25
41	0,80	1,85	2,38	2,52
42	0,46	0,86	0,21	0,24
43	96,18	111,96	0,38	0,33
44	1,04	0,32	0,31	0,29
45	0,02	0,59	1,25	1,29
46	9,13	8,48	2,43	2,28
47	0,64	1,57	1,53	1,58
48	6,77	6,55	3,10	2,41
49	0,59	0,13	1,50	1,49
50	0,86	0,75	2,43	2,53
51	1,49	2,20	1,33	1,11
52	0,54	0,24	2,40	2,25
53	0,86	0,50	0,13	0,09

54	0,34	0,80	5,24	5,08
55	0,10	0,13	0,80	0,88
56	2,79	3,88	10,65	6,73
57	0,24	0,34	0,34	0,40
58	1,41	1,41	1,37	1,18
59	4,93	4,31	1,32	1,35
60	3,88	1,34	4,51	3,71
61	0,10	0,54	0,69	0,75
62	0,46	0,24	0,08	0,12
63	0,50	0,80	0,64	0,55
64	0,69	0,50	2,93	2,64
65	0,06	0,75	0,25	0,20
66	0,21	0,38	2,28	2,25
67	0,99	0,69	2,14	2,01
68	10,56	10,89	0,89	0,82
69	2,10	2,79	1,63	1,27
70	0,46	0,41	0,60	0,53
71	0,30	0,27	1,42	1,28
72	4,39	3,09	1,57	1,34
73	8,26	8,44	1,55	1,35
74	1,74	0,92	2,20	1,77
75	0,27	0,69	0,94	0,69
76	0,99	0,92	0,51	0,46
77	0,80	1,34	5,47	4,25
78	0,38	1,12	1,25	1,17
79	500,00	500,00	0,18	0,11
80	0,21	0,30	0,13	0,13
81	0,18	0,34	1,00	0,86
82	0,75	0,30	0,65	0,58
83	0,69	3,09	0,64	0,58
84	2,29	2,59	4,60	4,97
85	0,06	0,30	1,50	1,41
86	0,21	0,99	0,68	0,73
87	500,00	500,00	2,75	2,42
88	0,64	5,35	0,98	0,97
89	4,00	0,30	0,57	0,57
90	2,25	0,39	3,98	3,84
91	0,16	1,64	0,63	0,71
92	17,68	12,49	0,34	0,44
93	5,08	4,67	0,36	0,36
94	0,39	0,39	3,67	3,77
95	5,28	5,40	0,43	0,48
96	0,00	0,00	0,81	0,84
97	4,19	0,59	1,94	1,89
98	957,86	1.000,00	0,12	0,07
99	264,84	245,99	0,18	0,19
100	0,59	0,23	0,18	0,16
101	0,34	1,22	1,71	1,89
102	989,60	912,34	0,35	0,25
103	3,14	4,19	25,00	20,95
104	1,28	0,00	0,38	0,26
105	6,09	1,46	0,06	0,06
106	7,64	1,84	0,07	0,05
107	0,39	3,59	0,80	0,64
108	10,90	13,23	0,57	0,41
109	0,94	2,02	0,61	0,62
110	11,90	7,53	1,96	1,97
111	0,00	0,00	3,79	2,96

112	23,90	23,70	0,60	0,64
113	5,58	0,23	6,63	5,50
114	40,13	35,56	1,11	1,10
115	0,59	0,97	0,29	0,27
116	11,01	20,00	1,17	1,19
117	4,67	0,83	1,13	1,02
118	0,48	0,83	2,20	2,11
119	2,47	1,12	1,14	1,08
120	0,23	0,00	0,56	0,54
121	0,82	2,22	0,79	0,72
122	0,83	2,92	4,88	4,19
123	144,75	101,42	1,46	1,44
124	25,21	33,64	1,42	1,30
125	5,17	0,83	41,88	38,40
126	1,46	2,04	1,01	0,92
127	0,16	0,83	0,58	0,47
128	2,04	0,39	2,00	1,74
129	112,78	106,78	1,92	1,87
130	5,20	5,37	2,35	2,24
131	6,49	5,67	0,49	0,42
132	992,72	1.000,00	1,03	1,07
133	1,04	1,73	5,44	4,76
134	8,84	7,94	1,33	1,25
135	34,26	35,81	0,31	0,32
136	1.000,00	1.000,00	0,48	0,51
137	1,22	0,10	1,12	1,09
138	0,48	1,41	1,89	1,63
139	4,88	3,47	1,01	1,16
140	8,71	7,22	1,58	1,83
141	1.000,00	1.000,00	0,76	0,73
142	0,88	0,88	1,07	0,96
143	9,91	7,38	0,11	0,12
144	1,22	0,96	0,05	0,06
145	1,96	2,57	19,96	19,77
146	146,54	156,80	0,50	0,49
147	1,73	0,05	1,74	2,00
148	1.000,00	1.000,00	0,25	0,23
149	0,00	0,14	0,41	0,52
150	0,60	1,22	1,46	1,31
151	1.000,00	1.000,00	0,56	0,74
152	5,17	5,20	1,42	1,36
153	2,57	0,29	2,05	2,09
154	5,72	5,17	0,50	0,49
155	843,58	1.000,00	0,29	0,38
156	1,52	1,32	9,90	9,60
157	1,04	0,48	0,28	0,33
158	5,20	5,05	0,86	0,79
159	1,52	0,60	0,18	0,20
160	1,62	1,52	0,59	0,57
161	1,84	0,54	6,46	6,23
162	0,67	1,41	1,22	1,18
163	969,58	928,72	0,45	0,37
164	1,52	0,14	0,29	0,29
165	0,38	0,60	0,41	0,33
166	1,32	2,96	0,37	0,34
167	0,00	1,62	0,27	0,23
168	5,05	5,44	0,53	0,51
169	713,54	742,58	0,57	0,56

170	0,17	0,67	1,43	1,35
171	7,17	5,32	0,35	0,37
172	1,41	0,08	0,21	0,15
173	2,32	2,20	0,11	0,13
174	0,24	0,08	0,21	0,18
175	0,73	0,88	7,27	6,37
176	1.000,00	1.000,00	23,88	20,99
177	0,32	0,53	1,23	0,06
178	616,10	768,38	19,53	13,55
179	1,13	1,32	1,63	1,29
180	0,12	1,42	0,71	0,96
181	0,01	0,16	1,27	1,15
182	0,09	0,19	0,95	0,93
183	0,32	0,00	2,23	2,24
184	0,16	0,47	0,90	0,83
185	0,32	0,19	13,59	11,43
186	0,23	0,96	5,39	5,22
187	7,72	7,72	1,38	1,37
188	0,00	0,53	0,21	0,21
189	0,66	0,16	0,44	0,52
190	0,00	0,12	14,31	11,86
191	0,23	0,00	2,01	1,57
192	0,42	3,75	10,74	8,32
193	0,42	0,32	1,20	1,13
194	835,76	729,16	0,18	0,15
195	0,73	0,32	1,71	1,36
196	3,11	5,38	10,01	6,50
197	0,88	1,04	1,05	1,07
198	1,32	1,97	14,46	15,43
199	1,13	0,16	4,74	4,20
200	11,18	10,32	10,09	8,87
201	0,96	0,66	3,07	2,38
202	0,28	0,37	0,01	0,01
203	1,13	0,32	0,45	0,42
204	0,42	2,59	0,77	0,62
205	669,30	705,76	13,54	10,02

Tabelle 39: Studienabschnitt-C: Anthropometrische Daten der Probanden - IL-6-Kinetik-Studie

Probanden-Nr.	Gewicht(kg)	Größe(m)	Alter [Jahre]	BMI	Körperfett (%)	waist-to_hip_ratio
1	72	1,82	24	21,74	10,20	0,83
2	62	1,71	23	21,20	8,90	0,82
3	59	1,64	22	21,94	13,40	0,73
4	57	1,73	25	19,05	12,70	0,76
6	68	1,80	22	20,99	8,70	0,82
7	71	1,74	23	23,45	12,90	0,86
8	68	1,69	24	23,81	13,30	0,80
9	80	1,79	24	24,97	17,00	0,84
10	82	1,82	23	24,76	12,90	0,84
12	68,5	1,77	25	21,86	13,80	0,81
13	77	1,79	25	24,03	13,80	0,87
14	60	1,80	26	18,52	7,10	0,82
15	57	1,62	23	21,72	14,70	0,77
16	76	1,75	24	24,82	14,50	0,83
17	72,5	1,74	27	23,95	11,00	0,81
Mittelwert	68,67	1,75	24,00	22,45	12,33	0,81
Standard-abweichung	8,22	0,06	1,41	2,02	2,64	0,04

Tabelle 40: Studienabschnitt-C: Leistungsdaten der Probanden - IL-6-Kinetik-Studie

P.b.-Nr.	VO2 max [ml min ⁻¹ kg ⁻¹]	Hf max [Hz]	Hfr IAS [Hz]	Laktat max [mmol l ⁻¹]	Laktat IAS [mmol l ⁻¹]	Leistung max W]	Leistung IAS [W]	Leistung relativ [W kg ⁻¹]
1	3,4	196	174	11,18	3,3	250	174	3,47
2	3,3	195	156	11,11	3,4	233,3	155	3,76
3	2,40	189	150	10,43	2,1	179	110	3,03
4	1,93	170	145	10,11	3,3	162,5	111	2,85
6	3,9	209	165	6,26	2,2	266,67	213	3,92
7	3,1	187	136	12,94	3,7	220,83	132	3,11
8	3,1	198	177	14,68	8	200	161	2,94
9	3,8	182	/	10,65	/	283,3	/	3,54
10	3,3	186	154	10,41	3,9	250	176	3,05
12	2,9	197	159	14,89	6,6	216	174	3,15
13	3,43	191	147	9,43	2,9	233,3	149	3,03
14	2,53	189	132	10,05	2,6	200	103	3,33
15	1,99	186	157	9,89	3,1	158,3	104	2,78
16	2,71	178	159	10,67	6,2	212,5	166	2,8
17	3,66	200	162	12,44	2,9	300	172	4,14
Mittelwert	3,03	185	152	11,01	3,87	224	150	3,26
Standard- abweichung	0,61	11	12	2,13	1,77	42	33	0,42

Tabelle 41: Studienabschnitt C – IL-6-Kinetik


P.b.-Nr.	vor iv	vor kap	50 W kap	1'p kap	45'p kap
1	0,78	1,11	1,17	8,49	18,58
2	0,36	0,28	0,53	6,54	30
3	0,48	0,52	0,69	4,45	78,63
4	0,73	0,74	2,13	3,68	60,25
6	0,73	1,84	3,68	3,91	8,44
7	0,33	0,26	0,6	2,65	60,68
8	0,75	0,74	0,95	3,33	15,26
9	0,1	0,3	0,51	7,11	42,63
10	0,49	0,53	0,84	2,4	15,3
12	0,39	1,38	3,17	7,87	77,76
13	1,11	1	0,67	2,78	28,3
14	0,17	0,23	0,33	4,77	7,79
15	0,38	0,88	1,26	2,52	15,03
16	0,1	0,88	0,5	5,54	5,06
17	0,44	0,45	0,53	4,36	10,66
Mittelwert	0,49	0,74	1,17	4,69	31,62
Standardabw.	0,28	0,46	1,02	2,00	25,87

Tabelle 42: Studienabschnitt C – CRP-Kinetik

Pb	vor CRP [mg/l]	Post CRP [mg/l]	1hp CRP [mg/l]	2hp CRP [mg/l]	6hp CRP [mg/l]	24hp CRP [mg/l]
41	0,18	0,23	0,24	0,22	0,63	1,47
42	0,39	0,34	0,31	0,35	0,54	1,38
43	0,09	0,10	0,10	0,09	0,13	0,83
44	0,10	0,10	0,09	0,11	0,36	2,30
45	2,08	2,35	2,25	2,30	2,25	2,35
46	0,14	0,25	0,22	0,25	0,67	1,38
47	0,07	0,08	0,09	0,10	0,17	0,82
48	0,22	0,28	0,28	0,25	0,32	0,33
49	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06
62	0,21	0,29	0,28	0,30	0,66	1,52
51	0,22	0,28	0,29	0,25	0,25	1,00
52	0,80	0,79	0,61	0,76	0,80	1,74
MW	0,53	0,63	0,6	0,62	0,92	2,26
ST	0,66	0,91	0,83	0,87	1,17	3,61
Min	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06
Max	2,44	3,83	3,4	3,58	5,35	17,33

7.2 Ergebnisausdrucke der Ringversuche

S.1/2
31288



Zertifikat

Ringversuch Oktober 2008


Gültigkeitsdauer 12 Monate
(R) = RiliBÄK: Gültigkeitsdauer 6 Monate

INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung
der Qualitätssicherung in
medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals Hämometerprüfstelle)
Ubier - Str. 20 / PF 250211
40223 / 40093 Düsseldorf
Tel. (0211) 159213 - 0
FAX (0211) 159213 - 30

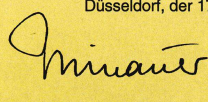
Der unten genannte Teilnehmer hat die Anforderungen bei folgenden Untersuchungen erfüllt:

CRP :	CRP (qual)	CRP (quant) (M.5) (R)
--------------	-------------------	------------------------------

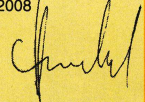
(R) : RiliBÄK



Düsseldorf, der 17.12.2008



Prof. Dr. med. Reinauer
(Leiter der Referenzinstitution)




Priv.-Doz. Dr. med. Klaus-Peter Hunzel
(Ringversuchsleiter)

31288
Dipl.Biol. Hans Josef Müller
FSU Jena Lehrstuhl f. Sportmedizin
Woellnitzer Str. 42
07749 Jena

322
IPCS: 59496

Bl. 711 Rvw=806, Crvz/Lzeit 8.12.2008 vp103710

S.1/1
31288



Teilnahmebescheinigung

Ringversuch Oktober 2008

INSTAND e.V.
Gesellschaft zur Förderung
der Qualitätssicherung in
medizinischen Laboratorien e. V.
(vormals Hämometerprüfstelle)
Ubier - Str. 20 / PF 250211
40223 / 40093 Düsseldorf
Tel. (0211) 159213 - 0
Düsseldorf, der 17.12.2008

31288 Dipl.Biol. Müller, FSU Jena Lehrstuhl f. Sportmedizin,

Hiermit wird bestätigt dass der oben genannte Teilnehmer am Ringversuch Oktober 2008 mit folgenden Untersuchungen teilgenommen hat:

CRP :	CRP (qual)	CRP (quant) (M.5) (R)
--------------	-------------------	------------------------------

(R) : entspricht RiliBÄK

Bl. 438 Rvw=806, Crvz/Lbesch. 8.12.2008 vp103710

IPCS: 59498

31288 S.1/1

**Instand e.V.
Ringversuche****Oktober 2008**
Ergebnis AusdruckUbler - Str. 20 / PF 250211
40223 / 40093 Düsseldorf
Tel (0211) 159213 - 0
FAX (0211) 159213 - 30**31288 Dipl.Biol. Hans Josef Müller, Jena**Seite 1 -E
8.12.2008

CRP (322) (Priv.-Doz. Dr. med. Klaus-Peter Hunfeld)		Probe	Ihr Wert	Zielwert	Bewertungsbereich	Abw. (%)
CRP (qual)						
alle Methoden		61	1	1, negativ		+
		62	3	3, positiv		
CRP (quant) mg/l						
sonst. Hersteller, M.5		61	1.72		0.0 - 4.99	
		62	34.80	29.0	21.1 - 36.9	20 +

Zum Ringversuch vorhandene Kommentare finden Sie im Internet unter www.instand-ev.de Ringversuche

322

31288

S. 396

+ : alle Werte im Bereich, - : nicht bestanden, X: Wert nicht im Bereich, R: Referenzmethodenwert
8.12.2008 12:06h Rv.806 Crv5 / Lerg vp103710

IPOS: 59499

S.1 / 1

T.31288 / 1

Instand e.V. Ringversuche		CRP Oktober 2008 Gesamtübersicht				Ubier - Str. 20 / PF 250211 40223 / 40093 Düsseldorf Tel (0211) 159213 - 0 FAX (0211) 159213 - 30	
CRP 322	Probe	Ziel- wert	Bewertungs- bereich	Teilnehmerkollektiv MW Vk Anz.			Bestehensquoten (%) Probe gesamt
1. CRP (qual)							
alle Methoden	61 62	1, negativ 3, positiv				159	96.2 95.0 98.1
2. CRP (quant) mg/l							
Meth.2 Reag.BW	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.40 5.71 20 28.7 5.79			100 100 100
Meth.3 Reag.BE	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		3.16 16.0 7 30.3 6.71			100 100 100
Meth.4 Reag.AB	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.55 11.2 12 29.4 9.06			91.7 91.7 100
Meth.4 Reag.AD	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		.980 13.4 11 27.3 11.8			100 100 100
Meth.4 Reag.BE	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.33 16.0 26 29.0 2.97			100 88.5 88.5
Meth.4 Reag.BG	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.06 9.79 8 28.9 3.93			100 87.5 87.5
Meth.4 Reag.BW	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		2.29 15.3 45 28.2 5.18			100 97.8 97.8
Meth.4 Reag.DG	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.53 4.26 6 34.7 4.74			100 83.3 83.3
Meth.4 Reag.KN	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		5.02 16.1 20 28.3 7.76			55.0 55.0 100
Meth.4 Reag.OL	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.66 12.0 36 28.7 6.45			94.4 80.6 83.3
Meth.4 Reag.PR	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		4.99 .120 10 26.7 16.4			60.0 50.0 70.0
Meth.4 Reag.RO	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.37 14.9 111 29.2 7.00			98.2 91.0 91.0
sonst. Hersteller, M.4	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.42 22.2 47 29.7 9.03			95.7 83.0 85.1
Meth.5 Reag.OR	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		2.02 18.1 37 32.7 9.05			97.3 89.2 91.9
sonst. Hersteller, M.5	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		1.43 25.3 12 32.0 13.2			91.7 83.3 83.3
restl. Methoden	61 62	0.0 - 4.99 29.0 21.1 - 36.9		2.15 16.4 5 28.7 3.11			80.0 80.0 100
							Gesamtquote= 87.2

7.3 Arbeitsanleitungen

7.3.1 Arbeitsanleitung “Ultrasensitiver CRP-ELISA”

1. Materialien

1.1. Chemikalien

1.1.1. Antikörper:

Funktion	Herkunft	Ziel	Hersteller	Preis
Capture-mAK	Maus	s-human-CRP	Fitzgerald Kat.Nr. 10-C33	318 Euro (ohne MWS)
Detektor-mAK-POD	Goat	s-human-CRP	Bethyl Kat.Nr. A80-125P	328 Euro (ohne MWS)

1.1.2. TMB-Substrat = 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin: Sigma T-8665

1.1.3. Coating-Puffer:

- Karbonat-Bikarbonat-Puffer, 0,05 M, pH = 9,6: Sigma C-3041

1.1.4. Block-Puffer:

- Bovines Serum Albumin Fraktion V: PAA Laboratories K41-001-100
- PBS pH = 7,0 : Life Technologies 140-40-091

1.1.5. Diluent: PBS; 1% BSA; 0,5%-Tween-20; 0,6 M Harnstoff; pH 7,5

1.1.6. Stopp-Lösung = 0,5 N H₂SO₄: Sigma S1526

1.1.7. Mikrotiterplatte: Nunc-MaxiSorb-Mikrotiterplatten 436111, 96 Wells

1.2. Laborgeräte und -zubehör:

1.2.1. Pipetten und -spitzen:

- Eppendorf Mehrkanalpipette Research pro 50 µl – 1200 µl
- Eppendorf Reference 10 µl – 100 µl
- Eppendorf Reference 100 µl – 1000 µl
- Falcon-Einmalpipetten 5 ml, 10 ml

1.2.2. Gefäße:

- 1,5 ml Eppendorff-Reagiergefäße
- 0,5 ml Eppendorff-Reagiergefäße
- 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen

1.2.3. Laborgeräte

- Plattenreader: Dynatech MR 4000
- Rollenmischer
- Vortex
- Orbitalschüttler

2. Vorbereitungen:

2.1. Verdünnen des Coating-Antikörper:

Der Coating-mAK hat eine Hersteller-Konzentration von 6,7 mg/ml. Die Sollkonzentration ist **0,5 µg/ ml** (Verdünnungsfaktor = 13.333).

Es wird insgesamt 20 ml Coating-Antikörper-Lösung benötigt: 1,5 µl Hersteller- Antikörper-Lösung wird mit 20 ml Coating-Carbonat-Puffer verdünnt: 13.333 fache Verdünnung. Das Coating-Antikörper-Volumen ist 200 µl pro Well.

Wichtig vor dem Pipettieren in die Wells:

- 1 Stunde mischen
- anschließend noch für 1 Stunde in den Kühlschrank.

2.2. Ansetzen des Blockpuffers:

PBS-3% BSA: 1,5 g BSA auf 50 ml PBS-Puffer

30 Minuten bei Zimmertemperatur auf dem Roller mischen. Nach Gebrauch sofort in den Kühlschrank. Das Blockpuffer-Volumen beträgt 200 µl pro Well. Den Blockpuffer höchstens 2 Tage verwenden.

2.3. Ansetzen des Probendiluent:

Bestandteile:

- PBS
- 0,6 mM Harnstoff
- 0,5 ‰ Tween-20
- 1% BSA

Bedarf: Es werden insgesamt 500 ml angesetzt:

a) Harnstoff:

0,6 M Harnstoff ist bereits aliquotiert: Der Harnstoff muss also 1000 fach verdünnt werden: 500 µl Harnstoff auf 500 ml : **0,6 mM Urea**.

b) BSA:

1% BSA-PBS: 5 g BSA auf 500 ml PBS

c) 0,5 ‰ Tween-20

250 µl Tween-20 auf 500 ml PBS = 0,5 ‰ Tween-20 (Achtung Änderung!!!).

2.4. Proben-Verdünnung

Die Proben werden 1: 2000 verdünnt. Das Probenvolumen ist 200 µl.

2 Verdünnungsschritte:

- 5 µl Probe mit 495 µl Diluent (1:100) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gut mischen (Vortex , anschließend über Kopf-schütteln)
- 50 µl verdünnte Probe mit 950 µl Diluent (1 : 20) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gut mischen (Vortex , anschließend über Kopf-schütteln)

2.5. Standard-Verdünnung:

Es werden von jedem Standard 200 µl pro Platte benötigt. Eine 2000 fach verdünnte Stammlösung mit einer Konzentration von 250 mg/l wird aus Kontrollmaterial hergestellt: Standardkonzentration: 25 mg/l 200 x verdünnt entspricht 250 mg/l 2000 x verdünnt. 5 µl CRP-Lösung + 995 µl Probendiluent

Tabelle 2: Standard-Verdünnungsreihe

Nr.	Standard-Konzentration [mg/ml]	Zugabe Stammlösung [µl]	Zugabe Diluent [µl]	Verdünnungsfaktor	Gesamt-Menge [µl]
1	0	0	1000	-	1000
2	1	4	996	250	1000
3	5	20	980	50	1000
4	25	100	900	10	1000
	Gesamt	124			

2.5. Herstellen der Detektor-Antikörper- Verdünnung

Es wird 200 µl Detektor-Solution pro Well pipettiert d.h. insgesamt wird 20 ml für eine Platte benötigt. Die Detektor-Soll-Konzentrationen ist 0,125 – 1,0 µg/ml. Die Herstellerkonzentration ist 1 mg/ ml, d. h es muß 1000 bis 8000 x verdünnt werden.

2,5 µl Detektor-Antikörper + 20 ml PBS-3%BSA (Blockpuffer). Anschließend auf den Mischer für 2 Stunden legen. Die Detektorlösung muss täglich frisch angesetzt werden.

3. Durchführung:

3.1. Coating:

100 µl pro Well. Inkubation über Nacht (besser 48 – 72 Stunden) im Kühlschrank.

3.2. Waschschrift

3 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.3. Blocken der Platten

300 µl Blockpuffer pro Well, Inkubation 1 Stunde Minuten bei Z.t. Zwischenzeitlich die Proben verdünnen.

3.4. Waschschrift

3 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.5. Pipettieren der Proben, Standards und Kontrollen.

100 µl Standard, Proben und Kontrollen in die entsprechende Wells.
Inkubation **3 Stunden** im Kühlschrank. Während dessen den Detektor vorbereiten (2 Stunden mischen).

3.6. Waschschrift:

5 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.7. Pipettieren des Detektor-Antikörpers

100 µl in die entsprechenden Wells. Inkubation für 2,5 Stunden im Kühlschrank:

3.8. Waschschrift

7 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.9. Substratinkubation

100 µl TMB-Substrat in jedes Well. Inkubation bei Z.T. für **5 Minuten !**

3.10. Pipettieren der Stopplösung

100 µl Stopplösung in jedes Well

3.11. Messung am Plattenreader

Unmittelbar nach Zugabe der Stopplösung. Die Messung erfolgt bei 450 nm. Die Referenzmessung erfolgt bei 630 nm. Die Auswertung erfolgt zeitgleich mit dem IBL-Auswerte-Programm.

4. Zusammenfassung:

Überblick der verschiedenen Arbeitsschritte:

1. Coating (12-72 Stunden)
2. Waschschrift (3 x)
3. Blocken (1 Stunde Zimmertemperatur), gleichzeitig Probenverdünnung
4. Waschschrift (3 x)
5. Proben pipettieren und Inkubation (3 Stunden)
6. Waschschrift (5 x)
7. Detektorinkubation (2 Stunden)
8. Waschschrift (7 x)
9. TMB-Substratinkubation (5 Minuten)
10. Stoppen
11. Messung und Auswertung

Kritische Arbeitsschritte:

1. Antikörpervermischung ausreichend lange (30 Minuten)
2. Coating 2-3 Tage im Kühlschrank: bessere Präzision
3. Proben vor dem Verdünnen vortexen
4. Sorgfältige Proben- und Standardverdünnung innerhalb einer Stunde
5. Alle Testbestandteile müssen vor der Durchführung der entsprechenden Arbeitsschritte Zimmertemperatur haben.

7.3.2 Arbeitsanleitung: Sensitiver human IL-6-Sandwich-ELISA

1. Material:

Inhalt des **des BD OptEIA h-IL-6 Sets** (Katalog-Nr. 555220):

Capture Antikörper: monoklonaler anti-human IL-6 Antikörper

- Flüssig, 1 Fläschchen
- Katalog-Nr. 51-26451E
- Batch-Nummer 76784
- Volumen: 1,0 ml
- Empfohlene Verdünnung: 1:250 in Coating-Puffer

Detektor-Antikörper: biotinylierter monoklonaler anti-human IL-6 Antikörper

- Flüssig, 1 Fläschchen
- Katalog-Nr. 51-26452E
- Batch-Nummer 76786
- Volumen: 1,0 ml
- Empfohlene Verdünnung: 1:250 in Assay Diluent

Enzymreagenz: Streptavidin-Meerrettich Peroxidase-Konjugat

- Flüssig, 1 Fläschchen
- Katalog-Nr. 51-9002208
- Batch-Nummer 76788
- Volumen: 1,0 ml
- Empfohlene Verdünnung: 1:250 im verdünnten Antikörper

Standards: rekombinantes lyophilisiertes human IL-6

- Lyophilisat, 1 Fläschchen
- Katalog-Nr. 51-26456E
- Batch-Nummer 79110
- Menge: 40 ng pro Fläschchen
- Rekonstituieren mit 1 ml deionisierten Wasser

Coating-Puffer:

- Karbonat-Bikarbonat-Puffer, 0,05 M, pH = 9,6: Sigma C-3041

Blockpuffer-Bestandteile:

- Bovines Serum Albumin Fraktion V: PAA Laboratories K41-001-100
- PBS pH = 7,0 : Life Technologies 140-40-091

Proben-, Standard-, Detektor-Diluent:

PBS-3% BSA; pH 7,9; 0,5%-Tween-20; 6 mM Harnstoff

HPR-POD-Diluent:

PBS-1% BSA; pH 7,9; 0,5%-Tween-20;

Stopp-Lösung = 0,5 N H₂SO₄: Sigma S1526

Mikrotiterplatte: Nunc-MaxiSorb-Microtiterplatten 436111

Pipetten:

- Eppendorf Mehrkanalpipette Research pro 50µl – 1200 µl
- Eppendorf Research 500 – 5000 µl
- Eppendorf Reference 10 µl – 100µl
- Eppendorf Reference 100 µl – 1000 µl
- Falcon-Einmalpipetten 5 ml, 10 ml

Plattenreader: Dynatech MR 4000

Rollmischer: RM5 (Karl Hecht GmbH)

2. Vorbereitungen:2.1 Berechnung der Anzahl benötigter Wells2.2 Coating- (= Capture-) Antikörper:

Das Beschichtungsvolumen ist 100 µl Antikörpers pro Well. Herstellen einer 250 fache Verdünnung: 13,2 µl Antikörper wird mit Karbonatpuffer auf 3300 µl aufgefüllt. 15 Minuten mischen auf dem Roller.

Pro Well 100 µl Capture-Antikörper pipettieren. Die Platte wird abgedeckt und kommt in den Kühlschrank. Der überschüssige Coating Puffer wird bei -30°C eingefroren.

2.3 Ansetzen des Blockpuffer:

1,5g BSA auf 50 ml PBS (3%), 30 Minuten mischen, kühl lagern.
Der Blockpuffer sollte täglich frisch angesetzt werden.

2.4 Waschpuffer

PBS 0,5‰ Tween 20 (maximal 3 Tage haltbar)

2.5 Assay-Diluent

Waschpuffer-3%-BSA-0,5‰ Tween 20-6 mM Harnstoff. Gut mischen!
Täglich frisch ansetzen

2.6 Standardreihe

2000 µl des **300 pg/ml Standard** aus dem Stockstandard (40.000 pg/ml) herstellen. (Verdünnung 1: 133): 15 µl Stockstandard mit Assay- Diluent auf 2000 µl auffüllen. Vortex. 600 µl Assay-Diluent in 6 Probenröhrchen geben. Die Probenröhrchen mit **150 pg/ml, 75 pg/ml, 37,5 pg/ml, 18,8 pg/ml, 9,4 pg/ml** und **4,7 pg/ml** bezeichnen.

Zu jedem zu präparierenden Standardröhrchen 600 µl der nächst höheren fertigen Standardkonzentration zufügen und vor jedem Transfer gut mischen.

Assay-Diluent dient als Nullstandard.

2.7 Ansetzen der Detektorlösung

- 13,2 µl Antikörper mit Blockpuffer-0,5‰Tween-5 mM Harnstoff auf 3300 µl auffüllen:
 - Aus praktischen Gründen: 0,3 g BSA in 10 ml Waschpuffer + 100µl 5 M Harnstoff ansetzen

- 30 Minuten mischen.

2.8 Ansetzen der HPR-POD-Lösung

- 13,2µl HPR-POD mit PBS-**1%BSA**-0,5%Tween auf 3300 µl auffüllen.
- 45 Minuten mischen

3. Durchführung:

3.1 Beschichten der Platte

- 100 µl Coating-Lösung pro Well
- Inkubation über Nacht im Kühlschrank
- Platte ausklopfen
- 5 Minuten umgedreht stehen lassen
- noch einmal ausklopfen

3.2 Blocken der Platte

- 300 µl Blockpuffer pro Well,
- Inkubation 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Platte ausklopfen
- 5 Minuten umgedreht stehen lassen
- noch einmal ausklopfen

3.3 Waschschrift:

3 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.4 Pipettieren der Standards und Proben

- 100 µl Standard bzw. Probe pro Well, Doppelbestimmung
- Inkubation über Nacht im Kühlschrank

3.5 Waschschrift

5 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.6 Pipettieren des Detektors:

- 100 µl Detektorlösung pro Well
- Inkubation 4 Stunden im Kühlschrank
- Beginn und Ende dokumentieren

3.7 Waschschrift:

5 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.8 Pipettieren der HPR-POD-Lösung

- 100 µl HPR-POD-Lösung in jedes Well.
- Inkubation für 40 Minuten bzw. 60 Minuten bei Raumtemperatur Beginn und Ende dokumentieren

3.9 Waschschrift:

7 x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer pro Well

3.10 Substrat-Inkubation:

- 100 µl Chromogen in jedes Well,
- Inkubation für 30 - 60 Minuten auf dem Orbitalschüttler.
- Beginn und Ende dokumentieren

3.11 Stoppen

100 µl Stopplösung in jedes Well

3.12 Extinktionsmessung bei 450 nm

4. Zusammenfassung:

Überblick der verschiedenen Arbeitsschritte:

1. Coating (12-72 Stunden)
2. Waschschrift (3 x)
3. Blocken (1 Stunde Zimmertemperatur), gleichzeitig Probenverdünnung
4. Waschschrift (3 x)
5. Proben pipettieren und Inkubation (3 Stunden)
6. Waschschrift (5 x)
7. Detektorinkubation (2 Stunden)
8. Waschschrift (5 x)
9. HPR-POD-Inkubation (45 Minuten)
10. Waschschrift (7 x)
11. TMB-Substratinkubation (30-60 Minuten)
12. Stoppen
13. Messung und Auswertung

Kritische Arbeitsschritte:

1. Antikörpervermischung ausreichend lange (2 Stunden)
2. Coating 2-3 Tage im Kühlschrank: bessere Präzision
3. Proben vor dem Verdünnen vortexen
4. Sorgfältige Proben- und Standardverdünnung innerhalb einer Stunde
5. Alle Testbestandteile müssen vor der Durchführung der entsprechenden Arbeitsschritte Zimmertemperatur haben.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich danken:

- Prof. Dr. med. H.H.W. Gabriel für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung dieser Arbeit, für die Korrektur des Manuskriptes und für die Begutachtung dieser Arbeit.
- Herrn PD. Dr. med. J. Scharhag für die Begutachtung dieser Arbeit
- Frau Dr. Berit Wanjek, Herrn Dr. Christian Puta, Herrn Dipl. Sportwiss. Dirk Nötzel, und Herrn Dipl. Sportwiss. Lars Donath, die mir jederzeit methodische, theoretische und praktische Hilfe zukommen ließen.
- Frau B. Dorschner und Herrn Dipl. Sportwiss. Klaus Oswald für die technische Unterstützung im Labor.
- Frau B. Tauch für ihre stete Hilfsbereitschaft im Rahmen der Gesundheitsbeurteilungen und den Belastungsuntersuchungen in der Ergometrie.
- allen Probanden für die Geduld und Mitarbeit.
- meiner Familie für ihre Unterstützung und Geduld.

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Fakultät für Sozial- und Verhaltenswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Zudem erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen sind in der Arbeit aufgeführt.

Die Auswahl und Auswertung des Datenmaterials sowie die Erstellung des Manuskripts erfolgte ohne die Hilfe Dritter. Insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Darüber hinaus haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe. Zudem wurde keine gleiche, keine in wesentlichen Teilen ähnliche und auch keine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule bzw. anderen Fakultät als Dissertation eingereicht.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Seitens des Verfassers bestehen keine Einwände, die vorliegende Doktorarbeit für die öffentliche Benutzung in der Thüringer Universitäts- und Landesbibliothek zur Verfügung zu stellen.

Jena, den

Unterschrift des Erklärenden

(Hans Josef Müller)

10 Lebenslauf

Hans Josef Müller



Angaben zur Person	
Geschlecht	Männlich
Geburtsjahr	1960
PLZ/Wohnort	07749 Jena
Land	Deutschland
Bundesland	Thüringen
Familienstand	Verheiratet
Kinder	3
Nationalität	Deutsch

Angaben zur Berufsausbildung	
Abschluss	Diplom-Biologe
Fachrichtung	Sportmedizin/ Präventionsmedizin
Bildungsweg	Allgemeine Hochschulreife 1980 Abschluss Diplom-Biologe 1992 Seit 2006 Doktorand am Lehrstuhl f. Sportmedizin FSU-Jena
Berufliche Tätigkeiten	1989-1997 Mitarbeiter Institut f. Sportmedizin Saarbrücken 1990-1998 Externer Dozent in Krankenpflegeschulen 1997-1999 Technischer Leiter Labor und Röntgenabteilung im Krankenhaus Meisenheim (Rheinlandpfalz) 1999-jetzt Technischer Mitarbeiter am Lehrstuhl f. Sportmedizin FSU- Jena
Arbeitsbereiche	Klinisch-Chemische Analysen Sportimmunologie Belastungsphysiologie Lehre